

**DER NACHWEIS DER BETA-REZEPTORENBLOCKER
ALPRENOLOL, BUNITROLOL, BUPRANOLOL,
PROPRANOLOL UND TIMOLOL
IN DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN PRAXIS**

Ludwig Riedl

—

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand : Prof. Dr. med. W. Spann

DER NACHWEIS DER BETA-REZEPTORENBLOCKER
ALPRENOLOL, BUNITROLOL, BUPRANOLOL,
PROPRANOLOL UND TIMOLOL
IN DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN PRAXIS



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Riedl

aus

Rott am Inn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München



Berichterstatter : Prof. Dr. med. W. Spann

Mitberichterstatter :

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 29.1.1981

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität München angefertigt.

Herrn Prof.Dr. med. W. Spann, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, München, gilt mein aufrichtiger Dank für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit.

Herrn Dr. L. v. Meyer danke ich herzlich für die jederzeit freundliche Beratung und Unterstützung.

Herrn Dr. G. Kauert und Herrn Dr. G. Drasch bin ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft zu Dank verpflichtet.

Die Gedächtnisrede wird von dem Vorsitzenden
des Ausschusses für die Angelegenheiten der
Verstorbenen und der Verstorbenen
in der Versammlung der Angehörigen der
Verstorbenen gehalten.

Gedächtnisrede

1.	Einleitung	1
2.	Lebenslauf des Verstorbenen	2
3.	Lebensleistung des Verstorbenen	3
4.	Lebensleistung des Verstorbenen	4
5.	Lebensleistung des Verstorbenen	5
6.	Lebensleistung des Verstorbenen	6
7.	Lebensleistung des Verstorbenen	7
8.	Lebensleistung des Verstorbenen	8
9.	Lebensleistung des Verstorbenen	9
10.	Lebensleistung des Verstorbenen	10
11.	Lebensleistung des Verstorbenen	11
12.	Lebensleistung des Verstorbenen	12
13.	Lebensleistung des Verstorbenen	13
14.	Lebensleistung des Verstorbenen	14
15.	Lebensleistung des Verstorbenen	15
16.	Lebensleistung des Verstorbenen	16
17.	Lebensleistung des Verstorbenen	17
18.	Lebensleistung des Verstorbenen	18
19.	Lebensleistung des Verstorbenen	19
20.	Lebensleistung des Verstorbenen	20
21.	Lebensleistung des Verstorbenen	21
22.	Lebensleistung des Verstorbenen	22
23.	Lebensleistung des Verstorbenen	23
24.	Lebensleistung des Verstorbenen	24
25.	Lebensleistung des Verstorbenen	25
26.	Lebensleistung des Verstorbenen	26
27.	Lebensleistung des Verstorbenen	27
28.	Lebensleistung des Verstorbenen	28
29.	Lebensleistung des Verstorbenen	29
30.	Lebensleistung des Verstorbenen	30
31.	Lebensleistung des Verstorbenen	31
32.	Lebensleistung des Verstorbenen	32
33.	Lebensleistung des Verstorbenen	33
34.	Lebensleistung des Verstorbenen	34
35.	Lebensleistung des Verstorbenen	35
36.	Lebensleistung des Verstorbenen	36
37.	Lebensleistung des Verstorbenen	37
38.	Lebensleistung des Verstorbenen	38
39.	Lebensleistung des Verstorbenen	39
40.	Lebensleistung des Verstorbenen	40
41.	Lebensleistung des Verstorbenen	41
42.	Lebensleistung des Verstorbenen	42
43.	Lebensleistung des Verstorbenen	43
44.	Lebensleistung des Verstorbenen	44
45.	Lebensleistung des Verstorbenen	45
46.	Lebensleistung des Verstorbenen	46
47.	Lebensleistung des Verstorbenen	47
48.	Lebensleistung des Verstorbenen	48
49.	Lebensleistung des Verstorbenen	49
50.	Lebensleistung des Verstorbenen	50
51.	Lebensleistung des Verstorbenen	51
52.	Lebensleistung des Verstorbenen	52
53.	Lebensleistung des Verstorbenen	53
54.	Lebensleistung des Verstorbenen	54
55.	Lebensleistung des Verstorbenen	55
56.	Lebensleistung des Verstorbenen	56
57.	Lebensleistung des Verstorbenen	57
58.	Lebensleistung des Verstorbenen	58
59.	Lebensleistung des Verstorbenen	59
60.	Lebensleistung des Verstorbenen	60
61.	Lebensleistung des Verstorbenen	61
62.	Lebensleistung des Verstorbenen	62
63.	Lebensleistung des Verstorbenen	63
64.	Lebensleistung des Verstorbenen	64
65.	Lebensleistung des Verstorbenen	65
66.	Lebensleistung des Verstorbenen	66
67.	Lebensleistung des Verstorbenen	67
68.	Lebensleistung des Verstorbenen	68
69.	Lebensleistung des Verstorbenen	69
70.	Lebensleistung des Verstorbenen	70
71.	Lebensleistung des Verstorbenen	71
72.	Lebensleistung des Verstorbenen	72
73.	Lebensleistung des Verstorbenen	73
74.	Lebensleistung des Verstorbenen	74
75.	Lebensleistung des Verstorbenen	75
76.	Lebensleistung des Verstorbenen	76
77.	Lebensleistung des Verstorbenen	77
78.	Lebensleistung des Verstorbenen	78
79.	Lebensleistung des Verstorbenen	79
80.	Lebensleistung des Verstorbenen	80
81.	Lebensleistung des Verstorbenen	81
82.	Lebensleistung des Verstorbenen	82
83.	Lebensleistung des Verstorbenen	83
84.	Lebensleistung des Verstorbenen	84
85.	Lebensleistung des Verstorbenen	85
86.	Lebensleistung des Verstorbenen	86
87.	Lebensleistung des Verstorbenen	87
88.	Lebensleistung des Verstorbenen	88
89.	Lebensleistung des Verstorbenen	89
90.	Lebensleistung des Verstorbenen	90
91.	Lebensleistung des Verstorbenen	91
92.	Lebensleistung des Verstorbenen	92
93.	Lebensleistung des Verstorbenen	93
94.	Lebensleistung des Verstorbenen	94
95.	Lebensleistung des Verstorbenen	95
96.	Lebensleistung des Verstorbenen	96
97.	Lebensleistung des Verstorbenen	97
98.	Lebensleistung des Verstorbenen	98
99.	Lebensleistung des Verstorbenen	99
100.	Lebensleistung des Verstorbenen	100

Der Nachweis der Beta-Rezeptorenblocker
 Alprenolol, Bunitrolol, Bupranolol,
 Propranolol und Timolol
 in der forensisch-toxikologischen Praxis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Definition, Struktur und Einteilung der Beta-Rezeptorenblocker	3
1.1.1.	Definition	3
1.1.2.	Grundstruktur	3
1.1.3.	Einteilung	3
2.	Wirkungsweise der Beta-Rezeptorenblocker	5
2.1.	Wirkungsqualitäten	5
2.2.	Pharmakologische Wirkung und therapeutische Anwendung	5
3.	Methoden der Literatur zum Nachweis der Beta-Rezeptorenblocker	6
3.1.	Verfahren zur Gruppentrennung und zur Anreicherung	6
3.1.1.	Extraktion mit Lösungsmitteln	6
3.1.2.	Extraktion mit nicht-ionogenen Harzen	8
3.1.3.	Extraktion mit ionogenen Harzen	8
3.1.4.	Verschiedene Isolierungsverfahren	9
3.2.	Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung	10
3.2.1.	Farbreaktionen	10
3.2.2.	UV-Spektroskopie	10
3.2.3.	Spektrofluorimetrie	11
3.2.4.	IR-Spektroskopie	12
3.2.5.	NMR-Spektroskopie	12
3.2.6.	Dünnschichtchromatographie	13

3.2.6.1.	Anwendung der DC zum Nachweis der Beta-Rezeptorenblocker	13
3.2.6.2.	Gebräuchliche Fließmittel	14
3.2.6.3.	Farbreagenzien	15
3.2.7.	Gaschromatographie	15
3.2.7.1.	Derivatbildung	20
3.2.8.	Verschiedene Nachweismethoden	22
3.3.	Stoffwechsel der Beta-Adrenolytika	23
3.3.1.	Absorption	23
3.3.2.	Bioverfügbarkeit	25
3.3.3.	Verteilung im Körper	26
3.3.4.	Proteinbindung	27
3.3.5.	Eliminierung	28
3.4.	Ergebnis der Literaturübersicht	33
4.	Eigene Untersuchungen	34
4.1.	Dünnschichtchromatographie	34
4.2.	Gaschromatographie	37
4.2.1.	Bemerkungen zur Problematik der GC	37
4.2.2.	Allgemeine gaschromatographische Arbeits- bedingungen	43
4.2.3.	Auswahl der Packungen und Programme	44
4.2.4.	Erzielte Trennungen	47
4.3.	Untersuchungen zur Derivatisierung	54
4.4.	Untersuchungen zum Nachweis von Beta-Blockern in biologischen Flüssigkeiten	57
4.4.1.	Wahl des internen Standards	57
4.4.2.	Arbeitsbedingungen	58
4.4.3.	Untersuchungen zur selektiven Extraktion von Beta-Blockern aus Urin	58
4.4.3.1.	Extraktion mit AMBERLITE XAD -2 - Austauschharz	58
4.4.3.2.	Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)	59
4.4.4.	Versuche zur Optimierung der Ausbeute	59
4.5.	Versuche zur Aufstellung der Eichgeraden	64
4.5.1.	Arbeitsbedingungen	64
4.5.2.	Arbeitsmethode	65

4.6.	Berechnung der Retentionsindices nach KOVATS für die Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000	65
4.6.1.	Theorie und Definition	67
4.6.2.	Arbeitsbedingungen	68
4.6.3.	Arbeitsmethode	69
4.7.	Anwendungsbeispiel anhand eines authentischen Patientenurins	71
4.7.1.	Arbeitsbedingungen	71
4.7.2.	Arbeitsmethode	71
4.7.3.	Nachweisgrenzen	73
4.8.	Arbeitsvorschriften	74
5.	Diskussion	77
6.	Zusammenfassung	79
7.	Literaturverzeichnis	81

1. EINLEITUNG

Die Beta-Rezeptorenblocker haben als Antagonisten des sympathischen Nervensystems am Herzen in den letzten Jahren in zunehmendem Maße therapeutische Beachtung gefunden (25).

Bereits im Jahre 1906 hatte DALE in seiner klassischen Veröffentlichung (65) beschrieben, daß natürliche und synthetische Sympathikomimetika an den einzelnen Zielorganen verschiedene Wirkungen zeigen. Eine systematische Bearbeitung des Gebiets der Beta-Rezeptoren blockierenden Substanzen wurde jedoch erst möglich, nachdem AHLQUIST (4,5,6) im Jahre 1948 seine Hypothese über die Existenz zweier verschiedener Rezeptorentypen des adrenergen Nervensystems aufgestellt hatte: Er vermutet Alpha-Rezeptoren, die hauptsächlich durch Noradrenalin, und Beta-Rezeptoren, die vornehmlich durch Isoproterenol stimuliert werden können (86). Nach der Synthese des ersten Beta-Rezeptorenblockers Dichlorisoproterenol (DCI^R) durch MILLS (88) im Jahre 1958 fand STEPHENSON (71), vom DCI^R ausgehend, im Pronetalol einen neuen Beta-Rezeptorenblocker, indem er die beiden Chloratome durch einen weiteren Ring ersetzte. Da die Substanz bei Mäusen Sarkombildungen auslöste (8,99), konnte sie nicht in die Therapie eingeführt werden. Kurze Zeit später entdeckten CROWTHER und SMITH (70) das Propranolol. Eingehende Untersuchungen zeigten, daß diese Substanz eine zehn mal stärkere Wirkung als das Pronetalol besitzt, ohne kanzerogen zu sein.

Der Nachweis einer spezifischen Blockade der Beta-Rezeptoren gelang POWELL und SLATER (65,107) sowie MORAN und PERKINS (95). Im Jahre 1970 erfolgte durch LEVY und WILKENFELD (87) eine weitere Unterteilung der Beta-Rezeptoren in Beta-I für Herz und Stoffwechsel und Beta-II für Bronchien und Gefäße (72).

Die Wirkungsweise der Beta-Sympathikolytika besteht in der kompetitiven Hemmung der adrenergen Beta-I- und Beta-II-Rezeptoren. Die einzelnen Präparate unterscheiden sich voneinander in der Organ- und Rezeptorspezifität, dem membranstabilisierenden und kardiodepressiven Effekt sowie der sympathikomimetischen Eigenwirkung in unterschiedlicher Ausprägung (13,57). Die Entwicklung von Substanzen mit einer möglichst großen Rezeptor- und Organspezifität führte besonders in den letzten Jahren zu einer Erweiterung des Indi-

kationsspektrums und der Anwendungsbreite der Beta-Rezeptorenblocker. Deshalb gewinnen sie in der Langzeittherapie zur Behandlung von hyperkinetischem Herzsyndrom, tachykarden Rhythmusstörungen, Hypertonie, Hyperthyreose, zur Prophylaxe von Angina pectoris und neuerdings auch in der Psychiatrie immer größere Bedeutung (57). Als unerwünschte Nebenwirkungen dieser Pharmaka sind Müdigkeit, verminderte Reaktionsfähigkeit und herabgesetzte Alkoholtoleranz bekannt (13,64,125,126). Nicht zuletzt wegen des ständig wachsenden Medikamentenkonsums der Bevölkerung häufen sich die Fälle, in denen bei Verkehrsdelikten die Einnahme von Tabletten als Grund des Fehlverhaltens genannt wird (31).

Aus der Toxikologie liegen Berichte über Morde und Suicide durch die Aufnahme einer Überdosis derartiger Medikamente vor (46,59). Dabei tritt der Tod als Folge von unspezifischen Begleitwirkungen ein, die sich u.a. als lokalanästhetische Effekte (57) auf das Reizleitungssystem zeigen. Dies führt zum totalen Herzblock infolge einer Bradykardie. Zur Aufklärung derartiger Fälle in der Verkehrs- und Gerichtsmedizin ist die quantitative Analyse der Beta-Rezeptorenblocker von großer Bedeutung.

Über die Nachweisbarkeit in biologischem Material liegen zahlreiche Veröffentlichungen vor. Sie beschreiben aber in der Regel nur die Identifizierung einer einzigen Substanz. Für die forensisch-toxikologische Praxis ist jedoch die Prüfung auf eine größere Anzahl derartiger Verbindungen unbedingt erforderlich.

1.1. Definition, Struktur und Einteilung der Beta-Rezeptorenblocker

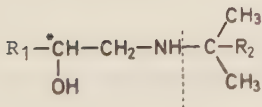
1.1.1. Definition

Sämtliche therapeutisch verwendeten Beta-Rezeptorenblocker gehören der Stoffklasse der Alkohole an und weisen zum Teil Ätherstruktur auf. Eine mögliche Definition ist folgende:

Beta-Rezeptorenblocker sind Verbindungen, die in relativ geringen Konzentrationen die Wirkung von Sympathikomimetika an adrenergen Beta-Rezeptoren durch kompetitive Verdrängung aufheben bzw. vermindern (57).

1.1.2. Grundstruktur

Im Formelbild der meisten Beta-Adrenolytika läßt sich eine Äthanolamin-Gruppe mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom erkennen (15). Als Grundgerüst kann folgende Struktur gelten:



R₁ : Phenoxy-Methyl-
Phenyl-
Aryl-

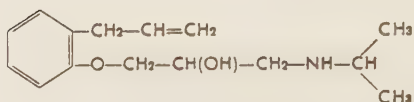
R₂ : H (Isopropyl-)
CH₃ (Isobutyl-)

* C : asymmetrisches
Kohlenstoffatom

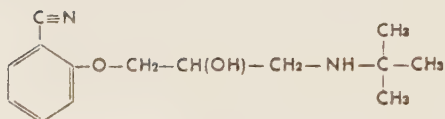
1.1.3. Einteilung

Die Beta-Rezeptorenblocker werden in der Regel in Aryläthanolaminderivate und Aryläther von Propanolaminen eingeteilt (120). Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen gehören alle der zweiten Gruppe an. Die abgebildeten Strukturformeln sind der PHARMAZEUTISCHEN STOFFLISTE (104) entnommen.

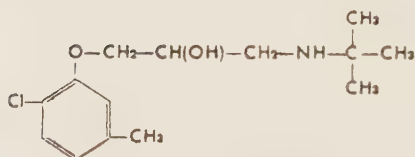
Aryläther von Propanolaminen



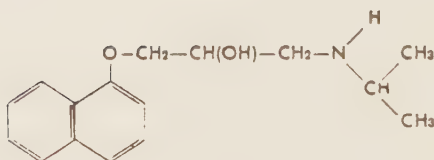
Alprenolol (INN)



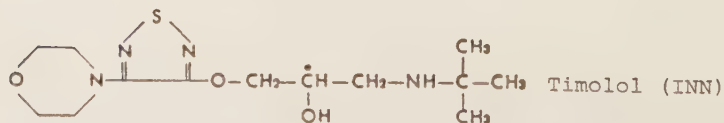
Bunitrolol (INN)



Bupranolol (INN)



Propranolol (INN)



Timolol (INN)

2. WIRKUNGSWEISE DER BETA-REZEPTORENBLOCKER

2.1. Wirkungsqualitäten

Für die volle sympathikolytische Wirksamkeit der Beta-Blocker ist die D-Konfiguration der Hydroxylgruppe der Seitenkette Voraussetzung (47,68). Als spezifische Hauptwirkungen gelten am Herzen die Abnahme der Frequenz, der Kontraktionskraft, der Reizbildung und Reizleitung sowie am arteriellen System eine Vasodilatation, die auch die Koronargefäße betrifft. Weiterhin ist bekannt, daß die Beta-Sympathikolyse zur Erschlaffung der Bronchial-, Darm- und Uterusmuskulatur führt.

Die unspezifischen Begleit- oder Membranwirkungen äußern sich als kardiodepressive, chinidinartige Effekte am Herzen (20), als lokalanästhetische, lidocainartige Wirkungen auf das Reizleitungssystem und als papaverinartige Spasmolyse an der glatten Muskelzelle (13,65). Sie sind unabhängig von der sterischen Konfiguration. Bestimmte Beta-Blocker haben auf die Rezeptoren gleichzeitig hemmende und erregende Wirkung. FORTH et al. (57) bezeichnen diese sympathikomimetische Eigenwirkung als "partiellen Agonismus", der jedoch nur bei Konzentrationen unterhalb therapeutischer Dosierung eine Rolle spielt.

2.2. Pharmakologische Wirkung und therapeutische Anwendung

Da Beta-Blocker die Frequenz, Wandspannung und Kontraktilität des Herzens vermindern, führen sie zu einer Senkung des Energie- und Sauerstoffbedarfs bei gleichzeitiger Vasodilatation der Herzkranzarterien. So wird eine gute Durchblutung erreicht, die Belastungstoleranz des Herzens erhöht und Angina-pectoris-Anfällen vorgebeugt. Da das sympathische Nervensystem entscheidenden Einfluß auf die Steuerung der Herzschlagfolge ausübt, beseitigen Beta-blocker Störungen der Impulsbildung und -Leitung durch Dämpfung adrenerger Einflüsse. Bei der Therapie von supraventrikulären Extrasystolen und paroxysmalen Tachykardien dürfte die Wirkung der Beta-Adrenolytika in erster Linie mit einer Verlangsamung der Leitungs-

geschwindigkeit und Erhöhung der Refraktärzeit am AV-Knoten zu erklären sein (65).

3. METHODEN DER LITERATUR ZUM NACHWEIS DER BETA-REZEPTORENBLOCKER

3.1. Verfahren zur Gruppentrennung und zur Anreicherung

3.1.1. Extraktion mit Lösungsmitteln

Sämtliche handelsüblichen Beta-Blocker haben basischen Charakter und verhalten sich wie Alkaloide. Sie lassen sich mit lipophilen Lösungsmitteln aus alkalischem Medium ausschütteln.

In der Regel wird Äther zur Extraktion verwendet. DI SALLE et al. (45) geben in ihren gaschromatographischen Studien über Propranolol die Extraktion aus natronalkalischem Plasma bei pH 9,5 mit Diäthyläther an. QUAGLIO und CAVICCHI (108) benutzen für ihren Propranolol-Nachweis Plasma von pH 8,0 und schütteln mit Äthyläther aus. STANKE (120) isoliert die Wirkstoffe Alprenolol und Timolol aus Tablettenspezialitäten nach der Methode von DI SALLE. EHRSSON (48) schüttelt Propranolol und dessen Konjugate aus alkalisiertem Urin bei pH 11 zweimal mit Diäthyläther aus. WALLE et al. (135) extrahieren das Isopropylamin, einen Metaboliten des Propranolol, aus natronalkalischem Hundeurin von pH 13 ebenfalls mit Diäthyläther.

Zur Gewinnung sauberer Extrakte und besserer Ausbeuten werden auch verschiedene andere lipophile Lösungsmittel verwendet. SHAND et al. (115) beschreiben die Extraktion von Propranolol aus alkalisiertem Serum mit dem dreifachen Volumen n-Heptan, das 1,5% Isoamylalkohol enthält. Nach einer weiteren Reinigung der organischen Phase durch Ausschütteln mit 0,1n Salzsäure, führen sie den angesäuerten Extrakt der spektrofluorimetrischen Untersuchung zu. ERVIK (50) isoliert Alprenolol aus natronalkalischem Plasma mit 2,5-fachem Vo-

lumen n-Hexan. Er gibt für diese Methode eine Extraktionsrate von 80 % des im Plasma enthaltenen Beta-Blockers an. OFFERHAUS und VAN DER VECHT (141) benutzen zur Extraktion von Propranolol aus alkalisiertem Plasma 5-faches Volumen n-Hexan, das 1,5% Isoamylalkohol enthält. Die Beimengung von Isoamylalkohol erhöhe die Wirksamkeit der Extraktion von 75 auf 94%. Zur Vorbereitung ihrer Proben für spektrofluorimetrische Untersuchungen verwenden diese Autoren die von SHAND et al. vorgeschlagene Methode.

POTTER (106), LAMEUR (85) und BLACK et al. (24) geben für die Extraktion von Propranolol mit Benzol eine ebenfalls hervorragende Extraktionskapazität an. WALLE (131) isoliert Propranolol aus natronalkalischem Plasma durch Einzel- und/oder Rückextraktion. Dabei extrahiert er zuerst mit Benzol bei pH 13. Nach dem Zentrifugieren und Abnehmen der Benzolphase schüttelt er diese mit 0,2n Schwefelsäure zur Rückextraktion aus, alkalisiert dann die isolierte wässrige Phase und wiederholt die Extraktion mit Benzol. Die Benzolphase wird anschließend auf ein Volumen von etwa 50 µl eingeengt und für die gaschromatographische Analyse verwendet. Bei seinen Extraktionen von Propranolol und dessen Metaboliten aus Herzgewebe des Hundes benutzt WALLE ausschließlich die Einzelextraktion mit Benzol. Er beschreibt diese Methode auch zur Isolierung von Alprenolol aus Plasma und Urin und empfiehlt sie für die meisten handelsüblichen Beta-Blocker und viele ihrer Metaboliten. Autoren wie OFFERHAUS und VAN DER VECHT (141) lehnen die Verwendung von Benzol wegen des zusätzlichen toxikologischen Risikos ab.

Zur Gewinnung von Propranolol aus Plasma puffern HAYES und COOPER (66) ihre Proben auf pH 10 und extrahieren anschließend mit Toluol. Mit diesem Extraktionsmittel sei eine 90%ige Ausbeute des in der Probe enthaltenen Beta-Blockers möglich. Die Firma SHARP & DOHME (117) ließ Timolol aus Arzneyspezialitäten nach Alkalisieren einer Tablettenlösung mit Hydrogencarbonatpuffer bei pH 9,7 ebenfalls mit Toluol isolieren.

Amylacetat verwenden AMBLER et al. (10) zur Isolierung von Propranolol aus natronalkalischem Serum für ihre spektrofluorimetrischen Untersuchungen. Die Amylacetatmischung dieser Autoren besitzt im Gegensatz zum n-Heptan-Isoamylalkohol von SHAND et al. (115) den Vorteil, weniger mit einer wässrigen Schicht mischbar zu sein. Dies

führe zu einer größeren Ausbeute an Propranolol und damit zu etwas höheren Konzentrationsangaben im Vergleich zu den von SHAND et al. ermittelten Werten. Die Extraktionsrate aus Serum beträgt mit dieser Methode etwa 95 %.

WALLE et al. (137) schütteln Propranolol und seinen 4-Hydroxy-Metaboliten aus Plasma, das mit Natriumhydrogensulfit auf pH 9,6 alkali-siert wurde, mit Äthylacetat aus. TINDELL et al. (142) extrahieren basische und neutrale Metaboliten des Propranolol aus Rattenleber bei pH 10 ebenfalls mit Äthylacetat. Saure Metaboliten isolieren sie folgendermaßen: Zuerst wird mit Benzol bei pH 10 vorextrahiert, um die Muttersubstanz sowie deren basische Derivate zu entfernen. Anschließend werden die sauren Metaboliten mit Äthylacetat bei pH 2 ausgeschüttelt. Der Propranolol-Abkömmling Alpha-Naphthol wird analog bei pH 7,4 gewonnen.

3.1.2. Extraktion mit nicht-ionogenen Harzen

Neben der Isolierung der Beta-Blocker durch Ausschütteln der Basen wird auch die Extraktion durch Absorption an nicht-ionogenen Harzen verwendet. Bei dieser Methode werden lipophile und hydrophile Substanzen gleichermaßen auf der Basis VAN DER WAALS'scher Kräfte von dem Austauschharz festgehalten und mit Elutionsmitteln verschiedener Löslichkeitseigenschaften eluiert.

EHRSSON (48) verwendet die Säulenpackung AMBERLITE XAD-2 zur Isolierung der diastereomeren Propranolol-O-Glucuronide aus Urin. Dazu gibt er bei pH 11 mit Diäthyläther gewaschenen, mit Salzsäure neutralisierten Urin auf die Säule und eluiert mit Wasser und Methanol.

3.1.3. Extraktion mit ionogenen Harzen

BODIN (28) verwendet das ionogene Austauschharz BIO-REX 70, ein carboxyliertes Acrylpolymer, das in eine Glassäule 2,8x1000 mm gepackt ist. Er benutzt diese Methode, um die Metaboliten von tritium-markiertem Alprenolol von Urin und Plasma zu trennen. Dazu gibt er Ätherextrakt auf die Säule und pumpt 0,5 M Ammoniumacetatpuffer von pH 6,5 mit einer konstanten Flußrate von 6 ml/h hindurch. Das

Eluat wird in einzelne Fraktionen geteilt, deren Radioaktivität ständig bestimmt wird. Diese Methode eignet sich besonders zur Abtrennung von Metaboliten mit Aminofunktion.

3.1.4. Verschiedene Isolierungsverfahren

BODIN (28) und BODIN et al. (29) verwenden bei ihren Studien mit tritiummarkiertem Alprenolol die enzymatische Hydrolyse von Urin, der mit Ammoniumacetatpuffer auf pH 6,5 eingestellt wurde. Nach Zugabe der Beta-Glucuronidase-Arylsulfatase wird 24h bei 37°C inkubiert. Nach abgeschlossener Reaktion und darauffolgender Gefrier-trocknung wird mit Methanol extrahiert. Diese Methode ermöglicht eine Erhöhung der im Urin nachweisbaren Menge von unmetabolisiertem Alprenolol von 1% auf etwa 8-10% der Dosis durch Spaltung der Glucuronide. WALLE und GAFFNEY (134) hydrolysieren bei ihren pharmakokinetischen Untersuchungen des Propranolol im Urin von Mensch und Hund verschiedene Metaboliten ebenfalls mit der enzymatischen Methode nach BODIN.

BOND (30) konnte mit Hilfe der Säurehydrolyse in 5n Salzsäure und der enzymatischen Hydrolyse mit Beta-Glucuronidase die beiden amphoteren Metaboliten von Propranolol und dessen 4-Hydroxyderivat aus Rattenurin freisetzen.

Mit Elektrophorese in 0,05m Natriumdihydrogenphosphat trennt BOND (30) saure und amphotere Metaboliten des radioaktiv markierten Propranolol im Rattenurin.

3.2. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung

3.2.1. Farbreaktionen

Wegen ihrer geringen Empfindlichkeit und Spezifität werden Farbreaktionen heute nur noch in seltenen Fällen zum Nachweis verschiedener Pharmaka herangezogen.

Derartige Nachweisverfahren für Beta-Blocker fanden sich lediglich in den Arbeiten von STANKE (120) und AUTERHOFF und STANKE (17). Diese Autoren empfehlen die Bromadditionsreaktion und die Entfärbung von Kaliumpermanganat als geeignete Farbreaktionen zum Nachweis der Allylverbindung Alprenolol. Ferner berichten sie über die Farbbildung der Phenolderivate Alprenolol und Propranolol nach Umsetzung mit Reagenzien, die konzentrierte Schwefelsäure enthalten. Sie führen diese Reaktionen sowohl in Lösung als auch auf Kieselgel-Dünnschichtplatten durch (s.a. 3.2.6.).

STANKE beschreibt die Farbreaktion nach ZWIKKER (16), die LIEBERMANN-Probe auf Nitrosamine sowie die Reaktion mit konzentrierter Salpetersäure für Alprenolol und Propranolol als positiv.

3.2.2. UV-Spektroskopie

Die Beta-Rezeptorenblocker besitzen in der Regel aromatische oder heterozyklische Strukturen, aufgrund derer sie hohe Absorption im ultravioletten Bereich zeigen. Somit ist es möglich, die UV-Spektroskopie zum quantitativen und qualitativen Nachweis dieser Substanzen heranzuziehen.

Da eine sichere Identifizierung mit dieser Methode allein nicht möglich ist, verwendet sie STANKE (120) in Kombination mit anderen Nachweisverfahren. Er fand für die Basen von Alprenolol und Propranolol eine Verschiebung der UV-Kurven um 2 nm nach höheren Wellenbereichen im Gegensatz zu denen der Hydrochloride. Der Kurvenverlauf sei charakteristisch, die Maxima liegen deutlich voneinander getrennt, sodaß diese Methode zur gleichzeitigen Identifizierung der beiden Substanzen herangezogen werden kann.

AUTERHOFF und STANKE (17) verwenden dieses Verfahren auch zur Bestätigung des dünnschichtchromatographischen Nachweises von Alpha-Naphthol, das aus Propranolol durch Phenolätherspaltung mit Brom- bzw. Jodwasserstoffsäure entsteht.

BOND (30) setzt die UV-Spektroskopie zum Identitätsnachweis des propionsauren Metaboliten von Propranolol im Urin mit der synthetisch hergestellten 2-hydroxy-3-(1'-naphthyloxy)-propionsäure ein.

3.2.3. Spektrofluorimetrie

Literatur für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Beta-Blockern mit Hilfe der Spektrofluorimetrie stand ausschließlich für Propranolol zur Verfügung.

SHAND et al. (115) entwickelten im Jahre 1970 eine fluorimetrische Methode zur Bestimmung des Propranololspiegels im Serum. Dabei schütteln sie einen organischen Serumextrakt mit 0,01n Salzsäure aus, weil die saure Phase höhere Fluoreszenzwerte als die basische erbringt. Ähnliche Verfahren benutzen BLACK et al. (24) sowie POTTER (106) und LAMEUR (85) zur Identifizierung des Propranolol im Plasma.

Da all diese Methoden in ihrer Anwendung wenig praktisch und die Ergebnisse zu ungenau sind, entwickelten AMBLER et al. (10) durch Modifikation der Arbeitsweise von SHAND et al. ein relativ einfaches Verfahren zur Propranololbestimmung im Serum. Durch Ausschütteln mit 0,01m Zitronensäure in Glykolreagens erhielten sie ein zehnfach höheres Standard/Leerwert-Verhältnis der Fluoreszenzrate als SHAND et al., die wässrige Salzsäure zur Extraktion benutzen. Somit konnten sie aufgrund der größeren Empfindlichkeit geringere Probemengen bis 5ng/ml Serum erfassen.

CHIDSEY et al. (35) kritisieren die bisher beschriebenen fluorimetrischen Verfahren, deren untere Nachweisgrenze im Gegensatz zu den empfindlicheren gaschromatographischen Detektionsmethoden zu hoch liege. OFFERHAUS und VAN DER VECHT (141) erarbeiteten jedoch später durch Modifikation sämtlicher bis dahin bekannter Extraktionsvorschriften eine fluorimetrische Nachweismöglichkeit, die auf Plasmaproben von 0,5-1,0ml anwendbar ist und eine Empfindlichkeit und Genauigkeit besitzt, die den Ergebnissen aus den gaschro-

matographischen Studien von DI SALLE et al. (45) nahekommmt.

3.2.4. IR-Spektroskopie

Die einzige zugängliche Studie über die Identifizierung von Beta-Blockern mit Hilfe der Infrarotspektroskopie wurde von STANKE (120) durchgeführt. Aufgrund der Valenzschwingungen der Äthyl-, Amino-, Carbonyl- und Isopropylgruppen sowie der Banden der verschiedenen Aromaten und deren Substituenten gelang ihm die Identifikation von Alprenolol und Propranolol. In dieser Untersuchung waren nur mit relativ großen Mengen an gereinigter Substanz befriedigende IR-Spektren zu erzielen. Da bei therapeutischer Dosierung in Körperflüssigkeiten nur sehr geringe Konzentrationen an Beta-Blockern vorliegen, und durch Extraktionsverfahren mit weiteren Verlusten gerechnet werden muß, bleibt die Anwendung der IR-Spektroskopie auf Fälle beschränkt, in denen z.B. durch Vergiftungen größere Substanzmengen aufgenommen wurden. Trotzdem sind auch hier wegen der Gefahr der Probenverunreinigung bei Isolierungsvorgängen zusätzliche Nachweise mit anderen Techniken zu empfehlen.

3.2.5. NMR-Spektroskopie

Untersuchungen von Beta-Blockern mit Kernresonanzspektroskopie lagen ebenfalls nur bei STANKE (120) vor. Zur Interpretation der NMR-Spektren, die er für die Substanzen Alprenolol und Propranolol erstellt hatte, dienten ihm die Protonensignale unterschiedlicher wasserstoffenthaltender Gruppen. Ebenso wie bei der IR-Spektroskopie ermöglichen auch hier die verschiedenen Substituenten an den Aromaten die Identifizierung und Unterscheidung der einzelnen Moleküle. Aufgrund ähnlicher Nachteile, wie sie für die IR-Spektroskopie beschrieben wurden, kann die NMR-Spektroskopie in der Regel nur zur Sicherung von Ergebnissen aus anderen Nachweistechiken herangezogen werden.

3.2.6. Dünnschichtchromatographie

3.2.6.1. Anwendung der DC zum Nachweis der Beta-Rezeptorenblocker

Zu Beginn der sechziger Jahre wurde die bis dahin häufig praktizierte Papierchromatographie von der empfindlicheren Dünnschichtchromatographie fast völlig verdrängt. Deshalb standen für Beta-Blocker ausschließlich dünnschichtchromatographische Studien zur Verfügung.

Da Beta-Blocker Basen sind, seien an dieser Stelle einige Arbeiten erwähnt, in denen dünnschichtchromatographische Nachweismethoden für alkalische Stoffe vorgestellt werden: VIDIC und SCHÜTTE (129) verwenden 0,1n wasserfreie, methanolische Ammoniaklösung als Fließmittel. MULE (96) und MULE et al. (97) geben in ihren Arbeiten über den Routinenachweis von Drogenmißbrauch zwei Systeme für basische Wirkstoffe an. FIKE (55) empfiehlt Kieselgelschichten, bei deren Herstellung 0,1m KHSO_4 -Lösung oder 0,1n Natronlauge benutzt werden.

Die umfassendste Arbeit über den dünnschichtchromatographischen Nachweis von Beta-Blockern veröffentlichte STANKE (120) im Jahre 1976. Er löst die Basen von Alprenolol und Propranolol in Methanol und trägt sie auf das häufig gebrauchte SILICAGEL F₂₅₄ von MERCK auf. Als Fließmittel dient ihm eine Mischung von Chloroform/Diäthylamin im Verhältnis 9:1. Die Identifizierung der Beta-Blocker erfolgt im UV-Licht nach Besprühen der DC-Platten mit verschiedenen Alkaloidfarbreagenzien.

AUTERHOFF und STANKE (17) weisen mit MARQUIS-Reagenz und Vanillin-Schwefelsäure über das bei der Phenolätherspaltung mit Bromwasserstoffsäure entstandene Alpha-Naphthol das Propranolol nach. Mit Hilfe dieser Methode ließ die Firma SHARP & DOHME (117) das Timolol untersuchen und gibt in einem hausinternen Bericht die Rf-Werte der freien Base sowie des Isomeren an.

QUAGLIO und CAVICCHI (108) veröffentlichen die Rf-Werte des Propranolol für acht verschiedene Laufmittel.

Die in den beschriebenen Studien gebräuchlichen Fließmittelsysteme finden sich in der Aufstellung unter 3.2.6.2. zusammengefaßt.

3.2.6.2. Gebräuchliche Fließmittel

Kieselgel mit und ohne Gips		Literatur
Aceton/Petroläther	1:1	(108)
Äthanol/H ₂ O/Eisessig	100:40:6	(108)
Äthylacetat/H ₂ O/Äthanol/ Butanol/NH ₃	50:40:30:10:1	(108)
Äthylacetat/Methanol/H ₂ O/NH ₃	85:10:3:1	(96)
Benzol/Aceton/Eisessig	7:3:1	(17,120)
Benzol/Aceton/NH ₃	50:50:1	(84)
Benzol/Äthanol	9:1	(17)
Benzol/Diäthylamin	9:1	(120)
Benzol/Diäthylamin	15:5	(120)
Benzol/Diäthylamin	19:1	(120)
Butanol/H ₂ O/NH ₃ /Äthanol	90:40:10:1	(108)
Butanol/NH ₃	200:3	(108)
Chloroform/Aceton	9:1	(49)
Chloroform/Aceton	85:15	(119)
Chloroform/Äther/Äthanol	70:30:30	(42)
Chloroform/Diäthylamin	9:1	(17,120)
Chloroform/Isopropanol/NH ₃	70:35:0,7	(36)
Chloroform/Isopropanol/NH ₄ OH	60:35:5	(119)
Chloroform/Methanol/Ammoniak	99:10:1	(96)
Cyclohexan/Diäthylamin	9:1	(129)
Cyclohexan/Diäthylamin	18:2	(120)
Essigsäure-Isobutylester/Aceton/ Butanol/H ₂ O/NH ₃	50:40:30:6:4	(119,140)
Methanol/Isobutylalkohol	3:2	(108)
Methanol mit 0,17% NH ₃		(129)
Methanol/NH ₃	100:1,5	(108)
Methanol/NH ₃	99:1	(37,42,96)
Methylenchlorid/Methanol/H ₂ O	79:15:2	(108)

Kieselgel mit 0,1n NaOH bzw. 0,1m KHSO₄

Cyclohexan/Benzol/Diäthylamin	75:15:10	(55)
Methanol		(55)

3.2.6.3. Farbreagenzien

Aufgrund ihres alkaloidalen Charakters werden für Beta-Blocker allgemein Basenfarbstoffe wie DRAGENDORFFs und MAYERS Reagenzien verwendet (119). Als alleiniges Färbemittel oder zur Farbintensivierung in Verbindung mit DRAGENDORFFs Reagenz empfehlen CUYERS (42), KÜCHLIN (84) und GOENECHEA (63) Eisen(III)-Chlorid-Lösung. STANKE (120) fand, daß die Substanzen Alprenolol und Propranolol bei Besprühen mit 50%iger wässriger Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen auf 150°C (89) sowie mit DRAGENDORFFs oder MAYERS Reagenz positiv anfärbbar sind. Zum Nachweis dieser beiden Beta-Blocker gibt er an, daß diese mit Vanillin-Schwefelsäure bereits ohne Erhitzen charakteristisch reagieren. Auch MARQUIS-Reagenz eignet sich gut zur Identifizierung dieser Sympathikolytika. QUAGLIO und CAVICCHI (108) gelang die Anfärbung von Propranolol mit DRAGENDORFFs Reagenz, Jodoform, in Methanol gesättigter Molybdän-Phosphorsäure und Para-Dimethylaminobenzaldehyd.

3.2.7. Gaschromatographie

Die Anforderungen an Empfindlichkeit und Spezifität sind in den letzten zehn Jahren derart gestiegen, daß sie die Nachweisgrenzen vieler Analyseverfahren überschritten haben. Deshalb trat die Gaschromatographie immer mehr in den Vordergrund, da sie als eine der wenigen Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse den heutigen Erfordernissen entspricht.

Einleitend zu diesem Kapitel seien die Arbeiten von WALLE und EHRSSON (132) sowie von ALBER (7) erwähnt, in denen Amine und Alkohole mit der relativ polaren Phenylsilikonöl-Phase OV17 detektiert werden. Die stationäre Phase 2% Carbowax 20m verwenden sie hauptsächlich für Alkohole, während sie für Amine, die als freie Basen vorliegen, die gleiche zusätzlich mit 0,5% KOH belegte Säulenpackung empfehlen. Als Trägermaterial diente Chromosorb W, das bei den Phasen OV17 und Carbowax 20m, nicht jedoch in Verbindung mit der KOH-Belegung, silanisiert war.

Für gaschromatographische Nachweisverfahren von Beta-Blockern

stand lediglich für die Substanzen Alprenolol und Propranolol sowie deren Metaboliten Literatur zur Verfügung. BODIN (28) verwendet zum Nachweis des 4-Hydroxy-Alprenolol, eines Hauptmetaboliten im Urin, die stationäre Phase 1% OV17.

Für seine quantitative Bestimmung von nichtmetabolisiertem Alprenolol in biologischen Flüssigkeiten benutzt ERVIK (50) eine mit 3% QF1 (Fluorsilikonöl) beladene Säule und setzt die in Hexan gelöste derivatisierte Substanz zur Chromatographie ein. Mit dieser Methode konnte er weniger als 2ng/ml Plasma oder Urin mit einer relativen Standardabweichung von 4% und einer Reproduzierbarkeit von 15% messen. Diese Empfindlichkeit ist erforderlich, um die extrem niedrigen Konzentrationen nach normaler Dosis von 50-100mg peroral oder 5mg intravenös nachweisen zu können. Als internen Standard verwendet er MIREX^R, das er erst nach Extraktion und Derivatisierung zusetzt. BODIN et al. (29) bedienen sich der Methode von ERVIK, um unverändertes Alprenolol in Körperflüssigkeiten und Geweben im Rahmen ihrer pharmakokinetischen Studien nachzuweisen. Als Verbesserung des Verfahrens von ERVIK (50) fügen JACK und RIESS (74) den internen Standard bereits vor Extraktion und Derivatisierung hinzu. Damit kompensieren sie Verluste an gesuchter Substanz, die durch diese Vorgänge unvermeidlich sind.

ERVIK (51) gibt bei seinen quantitativen Bestimmungen von Beta-Blockern auch die Retentionszeiten der Substanzen Alprenolol und Propranolol auf den Phasen JXR, QF1 und OV17 an. Als internen Standard setzt er 9-Bromphenanthren ein. Da sich auf den Phasen OV17 und QF1 zwar Alprenolol gut von Propranolol trennt, sich jedoch jeweils einer der beiden Beta-Blocker-Peaks mit dem des inneren Standards überlagert, ist für diese Säulenpackung eine andere Referenzsubstanz vorzuziehen. Eine vorzügliche gleichzeitige Trennung, sowohl der beiden Beta-Blocker voneinander als auch vom 9-Bromphenanthren konnte ERVIK mit der Phase JXR erzielen. Er ist der einzige Autor der zur Verfügung stehenden Literatur, der den Nachweis von mehr als einem Beta-Blocker im Sinne eines Screening-Verfahrens durchführte.

QUAGLIO und CAVICCHI (108) untersuchen in ihren gaschromatographischen Studien das Propranolol im menschlichen Plasma mit sechs verschiedenen stationären Phasen, konnten aber nur bei der Säulenpackung DC510 die Retentionszeit für diesen Beta-Blocker angeben.

DI SALLE et al. (45) beschreiben eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Propranolol im Humanplasma, bei der sie eine mit 3% OV17 belegte Säule und Pronetalol als internen Standard wählen. Sie können damit $77,8 \pm 1,2\%$ des tatsächlich im Blut vorhandenen Beta-Blockers nachweisen. Die kleinste noch erfaßbare Menge betrug 5ng/ml Körperflüssigkeit. Die Spezifität und Empfindlichkeit scheinen zufriedenstellend zur Messung von Blutspiegeln während Dauermedikation und zu pharmakokinetischen Untersuchungen von relativ niedrigen Konzentrationen.

WALLE (131) entwickelte eine hochspezifische und äußerst empfindliche gaschromatographische Methode, mit der er u.a. Alprenolol und Propranolol sowie die beiden Propranololmetaboliten N-desisopropylpropranolol und 1-(alpha-naphthoxy)-2,3-propylenglykol im Plasma, Urin und Herzgewebe bis zu einer Konzentration von 0,1ng/ml Probeflüssigkeit nachweisen konnte. Bei der Propranololbestimmung benutzt er den Beta-Blocker Oxprenolol, ansonsten das 1-Bromnaphthalen als inneren Standard und gibt die Retentionszeiten der analysierten Substanzen für die Phase OV17 an. Dieses Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung von Beta-Blocker-Konzentrationen im Plasma noch 12 - 24 Stunden nach einer geringen intravenös applizierten Dosis. Der Autor vermutet, daß es auf sämtliche Beta-Adrenolytika und viele ihrer Metaboliten in Körperflüssigkeiten und Geweben anwendbar sei. WALLE et al. (135) analysieren nach dieser Methode das Isopropylamin im Urin, das aus der oxidativen Desaminierung von Propranolol stammt.

Zur Identifizierung eines zu 4-Hydroxy-Propranolol isomeren Metaboliten aus Urin und Rattenlebermikrosomen benutzen WALLE et al. (136) eine mit 4% OV1 beschichtete Säule. Mit der stationären Phase 10% OV1 gelang WALLE et al. (137) die gleichzeitige Bestimmung von Propranolol und seinem 4-Hydroxy-Metaboliten im Plasma mit dem Beta-Blocker Oxprenolol als internen Standard.

2% OV1 wählten TINDELL et al. (142) zur Chromatographie von sieben Propranolol-Metaboliten in Rattenlebermikrosomen und ebenfalls das Oxprenolol als Bezugssubstanz. EHRSSON (48) weist Propranolol-O-Glucuronide im Urin mit 1% OV1 nach.

STANKE (120) identifiziert mit Hilfe der GC die bromierte Ätherseitenkette bzw. das Allyljodid, die bei Phenolätherspaltung des Propranolol mit Brom- bzw. Jodwasserstoffsäure entstehen. Er be-

Tabelle 1 : Verwendete GC-Säulen und Arbeitsbedingungen

Stationäre Phase	Trägermaterial (mesh)	Detektor (°C)
2% Carbowax 20m	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	ECD (165 ±1)
2% Carbowax 20m + 0,5% KOH	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	ECD (165 ±1)
10% DC710	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	FID (250)
10% DC510	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	FID (250)
3% JXR	Chromosorb Q, (100-120)	ECD (300)
1% OV1	Chromosorb W, (60-80)	ECD
4% OV1	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	ECD
10% OV1	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	ECD
1% OV17	Chromosorb Q, (80-100)	ECD (220)
1,4%OV17	Chromosorb W,AW-DMCS (80-100)	ECD
2% OV17	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	ECD (270)
2% OV17	Chromosorb Q, DMCS, (80-100)	FID (250)
2% OV17	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	ECD (165 ±1)
3% OV17	Chromosorb Q, (100-120)	ECD (270)
3% OV101	Chromosorb Q, (80-100)	ECD (280)
3% QF1	Chromosorb Q, (100-120)	ECD (200)
3% QF1	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	FID (250)
5% QF1	Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100)	FID (250)
10% SE52	Chromosorb W,AW-DMCS, (60-80)	FID (260)
1,5%SP2250	Supelcoport (100-120)	FID (250)
10% UCCW96	Chromosorb W,AW-DMCS, (60-80)	FID

Injektor Temp. (°C)	Ofentemp. (°C)	Trärgas (ml/min)	Lit.
-	-200	N ₂ (25)	(132)
-	-200	N ₂ (25)	(132)
250	185	He (30)	(108)
250	215	He (30)	(108)
-	160	Ar+5% Methan (50)	(51)
-	200	He (10)	(48)
-	180	He (10)	(136)
260	230	He (20)	(137)
220	170	-	(28)
-	200	- (10)	(135)
230	170	N ₂ (30)	(131)
250	200	He (30)	(108)
-	-200	N ₂ (25)	(132)
260	205	N ₂ (60)	(45)
210	158	N ₂ (68)	(74)
230	170	N ₂ (50)	(50)
250	180	He (30)	(108)
250	180	He (30)	(108)
200	110	N ₂ (48)	(120)
250	180	He (30)	(108)
-	-	-	(120)

weist ferner, daß sich das Allylbromid des Propranolol zu dem thermisch stabileren 1,3-Dibrompropan umsetzt, während das Alprenolol unter den gleichen Bedingungen ein Polymerisat bildet.

Den in der Literatur beschriebenen gaschromatographischen Verfahren gehen in der Regel Lösungsmittlextraktion sowie Derivatisierung der gesuchten Substanz voraus. Zahlreiche Verfasser bestätigen die Struktur der gaschromatographisch nachgewiesenen Stoffe in einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung. In den meisten Fällen benutzen die Autoren Glassäulen von 3-6ft Länge und einem Innendurchmesser von 2-4 mm. Lediglich STANKE (120) und ERVIK (50,51) verwenden Stahlsäulen in den üblichen Dimensionen für ihre Packungen 10% UCCW96 bzw. 3% QF1.

Die Tabelle 1 auf den Seiten 18/19 enthält die in den beschriebenen Studien angegebenen stationären Phasen und gaschromatographischen Arbeitsbedingungen. Erwähnenswert erscheint die Tatsache, daß nie die Brauchbarkeit eines Temperaturprogrammes getestet wurde.

3.2.7.1. Derivatbildung

Ein Ziel der Derivatisierung ist, reaktive Molekülteile wie phenolische und alkoholische Hydroxyl- und sekundäre Aminogruppen durch Koppelung mit geeigneten Reagenzien vor der gaschromatographischen Analyse zu inaktivieren. Dadurch werden Wechselwirkungen zwischen dem zu untersuchenden Stoff und der stationären Phase der Säulenpackung vermieden, die ansonsten zu schwächerer Auftrennung und schlechteren quantitativen Ergebnissen infolge Substanzverlust durch Bindung an die polaren Gruppen der stationären Phase führen würden.

Die Derivatisierungsmethoden der Literatur dienen in der Regel der chemischen Umstrukturierung der zu analysierenden Substanzen in eine für den Electron Capture Detector (ECD) geeignetere Form. Alle hierzu verwendeten Reagenzien wie z.B. siliciumorganische Verbindungen und perfluorierte Anhydride von niederen Fettsäurehomologen substituieren die funktionellen Gruppen von Beta-Blockern ausschließlich in wasserfreiem Medium.

BUTTS (33) derivatisiert zahlreiche Amine mit bis-(Trimethylsilyl)-trifluoracetamid zu Trimethylsilylabkömmlingen.

Am häufigsten wird in der Literatur über gaschromatographische Beta-Blocker-Analytik die Derivatisierung mit Trifluoracetanhydrid und Heptafluorobuttersäureanhydrid beschrieben. ÄNGGARD und SEDVALL (3), CLARKE et al. (38) sowie WILK et al. (139) benutzen diese Reagenzien zur Derivatisierung von Aminen und Katecholaminmetaboliten.

ERVIK (50) und WALLE (131) substituieren die beiden reaktiven Wasserstoffe in der Seitenkette des Alprenolol bzw. des Propranolol durch Trifluoracetylgruppen. Als Katalysator verwendet WALLE das Trimethylamin und empfiehlt diese Derivatisierung für sämtliche handelsüblichen Beta-Blocker und viele ihrer Metaboliten. Auf diese Weise acetylieren WALLE et al. (136, 137) das Propranolol und seinen 4-Hydroxy-Metaboliten sowie dessen Isomer aus Urin und Rattenlebermikrosomen, TINDELL et al. (142) die basischen Metaboliten, und EHRSSON (48) die Propranolol-O-Glucuronide aus Urin. BODIN (28) und ERVIK (50) identifizieren Alprenolol und seinen 4-Hydroxy-Hauptmetaboliten nach Isolierung aus Urin ebenfalls als Trifluoracetylverbindung.

Den quantitativen Nachweis von Aminen und Alkoholen mit ausreichender Empfindlichkeit im Picogrammbereich beschreiben die beiden Autoren WALLE und EHRSSON (132). Sie detegieren diese Substanzen als Heptafluorobutyrylderivate, die wegen ihrer starken Flüchtigkeit bei Ofentemperaturen unter 200°C gaschromatographisch analysiert werden können, sofern ihr Molekulargewicht den Wert von 270 nicht übersteigt. DI SALLE et al. (45) derivatisieren das Propranolol ebenfalls mit Heptafluorobuttersäureanhydrid.

WALLE (130) weist Amine als 2,4-Dinitrophenyl-Derivate nach. WALLE et al. (135) und TINDELL et al. (142) substituieren das Isopropylamin, einen Metaboliten des Propranolol, ebenfalls mit 2,4-Dinitrofluorbenzol und empfehlen diese Derivatisierungsvorschrift für alle Metaboliten von Beta-Blockern, die wie das Propranolol eine N-Isopropylgruppe aufweisen und über die oxidative Desaminierung abgebaut werden.

Abschließend sei bemerkt, daß insbesondere die Fluor- und Silylderivate sich gut zur GC eignen. Bei den Fluorverbindungen stellten ÄNGGARD und SEDVALL (3) eine sehr große Hydrolyseempfindlichkeit

der Esterbindung fest und führen das auf den starken elektronegativen Effekt der Fluoratome zurück. KAUERT (78) konnte dies auch bei den Trimethylsilyläthern in seiner Dissertation über die gas-chromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von biogenen Aminen feststellen. Da die Stabilität dieser Derivate sehr stark von den äußeren Arbeitsbedingungen abhängt, scheinen sie für die routinemäßige Verwendung ungeeignet. Der größte Nachteil derartigen Reagenzien ist jedoch, daß erst nach der Extraktion aus biologischen Medien eine Derivatisierung der zu analysierenden Substanzen möglich ist. Nicht zuletzt seien die hohen Anschaffungskosten der Fluor- und Silylverbindungen erwähnt.

Aus diesen Gründen hat KAUERT (78) eine Propionylierung entwickelt, die ein gleichzeitiges Derivatisieren und Extrahieren mit lipophilen Lösungsmitteln erlaubt. Die Brauchbarkeit dieser Methode wird in der vorliegenden Arbeit auch für Beta-Blocker untersucht.

3.2.8. Verschiedene Nachweismethoden

STANKE (120) weist die Beta-Blocker Alprenolol und Propranolol mit der Methode der wasserfreien Titration sowohl potentiometrisch als auch mit indikativer Äquivalenzpunktbestimmung nach. Die Titration erfolgt in einer Lösung von wasserfreier Essigsäure, Acetanhydrid und Quecksilberacetat. Das 1-Naphtholbenzein zeigte als einziger von siebzehn untersuchten Farbindikatoren einen scharfen Umschlagspunkt. Ferner stellt er die Verdrängungstitration mit 0,1n Natronlauge in einem Gemisch aus Äthanol und Chloroform als geeignete Methode zur Bestimmung der Hydrochloride von Beta-Blockern vor. Auch die Chlorid-Bestimmung nach VOLHARD erweise sich vorteilhaft für die quantitative Analyse der Substanzen Alprenolol und Propranolol.

Abschließend sei erwähnt, daß die bei STANKE (120) angegebenen Nachweismethoden nur für Reinsubstanzen geeignet und nicht im biologischen Medium durchführbar sind.

3.3. Stoffwechsel der Beta-Adrenolytika

Für die vorliegende Arbeit standen zahlreiche Veröffentlichungen über den Stoffwechsel der Beta-Blocker Alprenolol, Bunitrolol, Propranolol und Timolol zur Verfügung; lediglich für das Bupranolol war keine Literatur zugänglich. Die pharmakokinetischen Daten wurden jedoch zum Teil bei nichttherapeutischer Dosierung, mit unspezifischen Verfahren und oftmals nur im Tierversuch gewonnen. Zwei wichtige Übersichtsarbeiten, in denen die bisherigen Untersuchungsergebnisse über Biotransformation, klinische Pharmakokinetik und Distribution der Beta-Sympathikolytika Alprenolol, Propranolol und Timolol zusammengefaßt werden, publizierten PFEIFFER und ZIMMER (103) sowie JOHANSSON und REGÄRDH (77) in den Jahren 1975 und 1976.

3.3.1. Absorption

Die Beta-Blocker Alprenolol, Bunitrolol, Propranolol und Timolol werden in der Regel rasch und relativ vollständig im Gastrointestinaltrakt absorbiert. Aufgrund der sekundären Aminogruppe der Seitenkette mit einem pK_a -Wert von 9,5-9,7 liegen sie im sauren bzw. schwach alkalischen Magen-Darm-Milieu hauptsächlich in ionisierter, wasserlöslicher Form vor.

BODIN et al. (29) untersuchten u.a. die Absorption von Alprenolol bei Mensch, Hund und Ratte und geben bei allen drei Spezies eine gastrointestinale Aufnahme von 90% der per os verabreichten Dosis an. ÅBLAD et al. (2) sowie JOHANSSON et al. (76) finden für oral appliziertes Alprenolol relativ kurze Zeiten von 0,5-1,5 Stunden, bis Spitzenkonzentrationen im Serum gemessen werden können. Letztere Autoren beweisen in Studien mit radioaktiv markiertem Alprenolol, daß dessen Absorption im gesamten Verdauungstrakt stattfindet; die verschiedenen pH-Werte der einzelnen Gastrointestinalsekrete beeinflussen dabei die Absorptionsrate (110). Schließlich beobachten JOHANSSON et al. (76) bei peroral aufgenommenen Retard-Präparaten dieses Beta-Blockers eine verlängerte Absorptionszeit mit niedrigeren Spitzenkonzentrationen im Plasma.

Die Firma BOEHRINGER SOHN (26) berichtet in ihren pharmakokinetischen Untersuchungen über Bunitrolol bei Mensch, Hund und Ratte eine Absorption im Magen-Darm-Trakt von 90% der Dosis, wobei Maximalkonzentrationen im Serum nach 0,75-3,0 Stunden erreicht werden.

In seiner Studie über die pH-abhängige buccale Absorption verschiedener Beta-Blocker weist HICKS (67) eine rasche Aufnahme von Alprenolol und Propranolol im alkalischen Milieu nach, die bei Werten unter pH4 zum Erliegen kommt.

PATERSON et al. (101) und AMBLER et al. (10) ermitteln eine Zeit von 1-3 Stunden bis zum Auftreten von Plasmaspitzenwerten nach oral verabreichten Einzeldosen von 10-120mg Propranolol. SHAND et al. (115) weisen darauf hin, daß bei Nüchternheit des Probanden eine raschere Absorption dieses Beta-Blockers erfolgt als in Verbindung mit Speisen. PARSONS et al. (100) beobachten bei gastrointestinally insuffizienten Patienten im Gegensatz zu gesunden Personen bedeutend höhere Propranolol-Konzentrationen im Plasma und deuten dies mit einem reduzierten Metabolismus während des Absorptionsvorgangs aufgrund morphologischer und enzymatischer Veränderungen der Magen-Darm-Mucosa. Ein derartiges Malabsorptionssyndrom stellen KENDALL et al. (81) bei Gesunden nach Neomycingabe fest und beweisen damit, daß strukturelle Umwandlungen der Verdauungsschleimhäute die Absorption von Propranolol beeinflussen.

Für Timolol geben TOCCO et al. (128) in Untersuchungen an Mensch, Hund und Ratte eine Resorption von 90% der oralen Dosis an.

JOHNSSON und REGÅRDH (77) beschreiben eine verminderte Absorption von Beta-Blockern bei älteren Personen und Patienten mit Niereninsuffizienz.

Erwiesene Einflüsse von Speisen und verschiedenen pharmakologischen Darreichungsformen auf die Absorptionsrate werden in der Regel bei allen Untersuchungen auf diesem Gebiet vernachlässigt, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studien wesentlich eingeschränkt ist.

3.3.2. Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit ist definiert als relativer Anteil einer applizierten Substanz, der in den großen Kreislauf gelangt, und als dessen Anflutungsgeschwindigkeit (11). Auch die Beta-Blocker unterliegen diesem Effekt, sodaß nur ein gewisser Prozentsatz der im Gastrointestinaltrakt resorbierten Dosis auch die systemische Zirkulation erreicht. Dies ist in geringem Maße auf eine Metabolisierung der Substanz bereits in der Magen-Darm-Mucosa, hauptsächlich aber auf die Extraktionsrate im enterohepatischen Kreislauf zurückzuführen, die nach Untersuchungen von GIBALDI et al. (60) vom hepatischen Blutfluß und der Leber-Clearance des betreffenden Stoffes abhängt. Somit bedingt eine niedrige hepatische Clearance eine hohe systemische Verfügbarkeit und umgekehrt.

Nach ÅBLAD et al. (1) und v. BAHR et al. (18) zeigen der Beta-Blocker Alprenolol, nach AMBLER et al. (10) und SHAND et al. (115) das Propranolol aufgrund ihrer starken Affinität zu Lebergewebe eine sehr hohe 'first-pass' Elimination durch dieses Organ. Deshalb ist das Verhältnis zwischen Bioverfügbarkeit und oral applizierten Einzeldosen sehr klein. Nach ÅBLAD et al. (2) sowie SHAND und RANGNO (116) erreicht bei Erhöhung der Dosis und/oder Dauermedikation zunehmend mehr Alprenolol bzw. Propranolol ohne präsystemische Eliminierung den großen Kreislauf. Die zuletzt genannten Autoren erklären diese nicht-lineare orale Bioverfügbarkeit mit einer Sättigung des 'first-pass' Effekts. Diese Vermutung wird von EVANS und SHAND (53, 54) durch Versuche am Menschen mit Propranolol bestätigt. Damit konnte für diese Substanz eine dosisabhängige Bioverfügbarkeit bei therapeutischer Dosierung festgestellt werden. Ob eine ähnliche kinetische Situation auch beim Alprenolol vorliegt, wurde bisher noch nicht untersucht, wird aber von SHAND (114) aufgrund großer Ähnlichkeiten mit Propranolol als wahrscheinlich angenommen. Die Bildung von aktiven 4-Hydroxy-Metaboliten, wie sie von ÅBLAD et al. (1) und BODIN (28) bei Alprenolol und PATERSON et al. (101) bei Propranolol beschrieben wird, kompensiert teilweise die Verluste durch den 'first-pass' Effekt, verhindert aber gleichzeitig die korrekte Einschätzung der wirksamen Menge an Beta-Blocker im großen Kreislauf und damit die genaue Bestimmung der Bioverfügbarkeit. SMOLEN und SCHOENWALD (118) stellen für die-

sen Fall eine Methode vor, die eine genaue Berechnung der Menge an aktiver Substanz in der systemischen Zirkulation erlaubt. So zeigt die Bioverfügbarkeit von Alprenolol bei v. BAHR et al. (19) und RAWLINS et al. (109) sowie von Propranolol bei AMBLER et al. (10), BODEM et al. (27), COLTART und SHAND (40) und SHAND et al. (115) nach oraler Applikation interindividuelle Schwankungen bis zum Siebenfachen der Spitzenkonzentrationen im Plasma, während nach intravenöser Gabe diese Werte nur bis zum Zweifachen variieren. Die Firma BOEHRINGER SOHN (26) teilt für den Beta-Blocker Bunitrolol nach intravenöser Applikation einen hohen Anteil an fäkalen Ausscheidung bei Mensch, Hund und Ratte mit. Dies läßt, im Zusammenhang mit dem biphasischen Verlauf des Rattenblutspiegels, auf einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf des Bunitrolol schließen. Weiterhin konnte nach oraler Medikation eine höhere Metabolisierungsrate und damit niedrigere Bioverfügbarkeit als nach intravenöser Verabreichung festgestellt werden. Die Ursache hierfür dürfte mit einem Abbau der Substanz während der Absorption in der Darmmucosa erklärbar sein.

3.3.3. Verteilung im Körper

Nach Angaben von JOHNSON und REGÄRDH (77) verteilen sich die meisten Beta-Blocker sehr rasch im Körper. Die Distributionshalbwertszeiten der einzelnen Substanzen bewegen sich zwischen 5 und 30 Minuten nach intravenöser Applikation. Das Verteilungsvolumen variiert um das Drei- bis Vierfache zwischen den einzelnen Stoffen, übertrifft aber bei allen den intravasalen Raum, obwohl sie sich in der Fettlöslichkeit (61) und der Bindung an Plasmaproteine (52) stark voneinander unterscheiden.

HAYES und COOPER (66) beschreiben eine Verteilungshalbwertszeit des Propranolol von 10 Minuten und eine 40-fach höhere Konzentrierung dieses Beta-Blockers in der Lunge als im Blut. Wie auch BODIN et al. (29), stellen sie bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion eine Erhöhung des Verteilungsvolumens fest. Tierversuche dieser Autoren ergaben für die relativ stark lipophilen Beta-Blocker Alprenolol und Propranolol eine Äquilibrierung zwischen Gehirn und Plasma innerhalb der ersten 30 Minuten nach intravenöser

Injektion .Dabei war die Konzentration an unveränderter Substanz im ZNS 10-15mal höher als im Plasma.Postmortem-Versuche bestätigten diese Werte auch beim Menschen.

BODIN et al.(29) fanden innerhalb der ersten 24 Stunden nach intravenöser Gabe ein hohes Maß an extravaskulärer Verteilung des Alprenolol mit besonders deutlichem Konzentrationsanstieg in der Lunge bzw. nach oraler Verabreichung in der Leber.

3.3.4. Proteinbindung

Die Bindung an verschiedene Proteine des Blutplasmas hat bedeutenden Einfluß auf die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften vieler Wirkstoffe.KOCH-WESER und SELLERS (82) zeigen,daß das Ausmaß der Proteinbindung direkten Einfluß auf die Distributions- und Eliminationskinetik hat.

Die wenigen Veröffentlichungen über Serumproteinbindung von Beta-Blockern variieren in den Untersuchungsmethoden so stark,daß ein relevanter Vergleich zwischen den einzelnen Ergebnissen schwierig ist.Dennoch zeigen die Resultate,daß das Ausmaß an Proteinbindung trotz struktureller Ähnlichkeiten der Beta-Adrenolytika starken Schwankungen unterliegt.

Aufgrund seiner hohen Fettlöslichkeit ist das Propranolol zu insgesamt 93% an Serumproteine gebunden (54),woran menschliches Serumalbumin zu 62% beteiligt ist.SHAND (114) vermutet,daß die Plasmaproteinbindung als Carriersystem für den Transport des Propranolol zur Leber dient,welche sowohl die gebundene als auch die freie Form aus dem Blut eliminieren kann.EVANS und SHAND (54) sowie JOHANSSON et al.(75) stellen für das Propranolol fest,daß das Maß an Proteinbindung in umgekehrter Relation zur Konzentration des Pharmakon steht.Da diese Untersuchungen jedoch bei einem Wirkstoff/Protein-Verhältnis weit über therapeutischen Bedingungen durchgeführt wurden,dürfte die Proteinbindung im therapeutischen Bereich höher liegen.AMBLER et al.(10) berichten über Wechselwirkungen zwischen Propranolol,Diphenylhydantoin und Procainamid und vermuten als Ursache ähnliche Bindungsverhältnisse im Serum.Nach Untersuchungen am Menschen von JOHANSSON et al.(76) unterliegt das ebenfalls stark lipophile Alprenolol bei therapeuti-

scher Dosierung zu 85% der Serumproteinbindung, woran die Albumine nach APPELGREN et al. (12) zu 40%, nach GIUDICELLI et al. (62) zu 60% beteiligt sind.

3.3.5. Eliminierung

Über die Ausscheidung der Beta-Blocker und die Untersuchung ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten liegen vor allem für das Propranolol zahlreiche Veröffentlichungen vor. Insgesamt werden für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen Eliminationshalbwertszeiten von zwei bis vier Stunden und deren Unabhängigkeit vom Applikationsmodus angegeben. Viele Autoren beschreiben den Einfluß von Leber- und Nierenerkrankungen auf die Eliminationsrate. Eine vermehrte renale Ausscheidung infolge pH-Erhöhung des Urins berichten KAYE et al. (79) für das stark lipophile Propranolol und führen dies auf verstärkte tubuläre Rückresorption im alkalischeren Milieu zurück. Auf die unterschiedliche Ausscheidungskinetik der einzelnen Beta-Blocker wurde bereits bei der Plasmaproteinbindung hingewiesen. Ferner spielt die Lipophilie der verschiedenen Pharmaka eine wichtige Rolle: Stark fettlösliche Stoffe wie Alprenolol und Propranolol werden zum Großteil durch Metabolismus in der Leber eliminiert, während die Ausscheidung von Substanzen mit geringerer Lipophilie in der Regel über die Nieren erfolgt. Wie das Verhältnis zwischen unveränderter Reinsubstanz und Metaboliten im Urin zeigt, sind bei den meisten Beta-Sympathikolytika beide Systeme mit unterschiedlicher Gewichtung beteiligt.

Als Stoffwechselwege, die allen Beta-Adrenolytika zu eigen sind, beschreiben JOHNSON und REGÄRDH (77) die aromatische und aliphatische Hydroxylierung, die oxidative Desaminierung und O-Desalkylierung mit anschließender Seitenkettenoxidation sowie Konjugation der sekundären Alkoholgruppe der Seitenkette mit Glucuronsäure.

BODIN (28) gelang die Identifizierung der Metaboliten von oral appliziertem, tritiummarkiertem Alprenolol im Urin beim Menschen zu 80%, bei Hund und Ratte zu 60 bzw. 40% der ausgeschiedenen Radioaktivität. Als Hauptmetaboliten identifizierte er das 4-Hydroxy-

Alprenolol zu 40% der ausgeschiedenen Radioaktivität bei Mensch und Hund sowie zu 30% bei der Ratte. Weitere Metaboliten sind das bei allen drei Spezies zu 1% vertretene N-Desiso-Alprenolol sowie eine Reihe bisher nicht identifizierter, größtenteils saurer Stoffe, die beim Menschen 20%, bei Hund und Ratte 40 bzw. 60% darstellen. Dazu kommt ein relativ hoher Anteil an konjugierter Reinsubstanz, der beim Menschen 36%, bei Hund und Ratte 20 bzw. 13% beträgt. Über die pharmakologische Aktivität des 4-Hydroxy-Alprenolol berichten ÅBLAD et al. (1) und BODIN (28). BODIN et al. (29) fanden beim Menschen eine 95%ige renale Ausscheidung der zugeführten Radioaktivität innerhalb von 48 Stunden, während Hund und Ratte in derselben Zeit nur 70 bzw. 30% renal, dafür aber 10 bzw. 55% biliär eliminieren. Als Reinsubstanz im Urin bzw. den Faeces erscheint bei den drei Spezies maximal 1% der Dosis.

Die Firma BOEHRINGER SOHN (26) ließ die Eliminationscharakteristika von ^{14}C -markiertem Bunitrolol nach Applikation peroraler Einzeldosen von 2,0-10 mg und intravenösen Gaben von 1,0-2,5 mg am Menschen, sowie nach Verabreichung von 50mg/kg per os und i.v. Injektion von 10mg/kg an Hund und Ratte untersuchen. Die Eliminationshalbwertszeiten betragen unter peroralen Bedingungen beim Menschen 6,2, beim Hund 3,5 und bei der Ratte 1,9 Stunden, während sie unter intravenösen Voraussetzungen beim Menschen auf 6,0, beim Hund auf 3,0 und bei der Ratte auf 0,5 Stunden reduziert sind. Bei allen drei Spezies werden nach beiden Applikationsarten 50-60% der Dosis renal und der Rest faekal ausgeschieden. Bunitrolol wird fast vollständig metabolisiert, wobei nach oraler Zufuhr aufgrund von Stoffwechselvorgängen in der Magen-Darm-Mucosa eine höhere Metabolisierungsrate nachgewiesen wurde als nach intravenöser Injektion. O-Nitrilo-phenoxy-milchsäure sowie p-Hydroxy-Bunitrololhydrochlorid und seine Konjugate wurden als Hauptmetaboliten bei Hund bzw. Mensch und Ratte identifiziert.

In fünf verschiedenen Studien wurden Eliminationshalbwertszeiten des Propranolol beim Menschen von 1,7 bis 3,5 Stunden ermittelt (28, 54, 76, 101, 115). Die fäkale Ausscheidung erfolgt zu 10-25% der Dosis bei Hund und Ratte (66), während sie beim Menschen nur 1-4% beträgt (101). BOND (30) beschreibt in seiner Studie über den Metabolismus des Propranolol an Ratte und Kaninchen die Seitenkettenoxidation und aromatische Hydroxylierung mit anschließender Gluc-

uronsäurekonjugation, ebenso wie WALLE und GAFFNEY (134), als Hauptabbauege dieses Beta-Blockers. Als Metaboliten identifizierte er die 2-Hydroxy-3-(1-naphthyl-oxo)-propionsäure (30%) und amphotere Stoffwechselprodukte wie Glucuronide des Propranolol und seines 4-Hydroxy-Derivats (70%). Drei Jahre später untersuchten PATERSON et al. (101) diese Vorgänge mit Hilfe von ^{14}C -markierter Substanz am Menschen und konnten die Naphthoxymilchsäure als Hauptmetaboliten des Propranolol mit einem Anteil von 20% der peroral und 40% der intravenös zugeführten Radioaktivität nachweisen. Ferner teilen sie mit, daß nach intravenöser Zufuhr kein 4-Hydroxy-Propranolol im Urin festzustellen sei und vermuten deshalb die Bildung dieses Metaboliten in der Darmschleimhaut oder im -lumen. COOPER und HAYES (41) dagegen behaupten in einer persönlichen Mitteilung, daß die Hydroxylierung auf jeden Fall in der Leber erfolge, sofern genügend hohe Mengen an Beta-Blocker die Leber erreichen, um den 'first-pass' Effekt abzusättigen.

GEORGE et al. (59) ermitteln eine längere Eliminationshalbwertszeit für das linksdrehende, pharmakologisch wirksamere Isomer des Propranolol im Vergleich zur rechtsdrehenden Form und vermuten eine unterschiedliche Metabolisierung und Ausscheidung. EHRSSON (48) weist mit kombinierter GC/MS das beim Menschen weitgehend zum diastereoisomeren Propranolol-O-Glucuronid umgesetzte Ausscheidungsprodukt nach. TINDELL et al. (142) identifizieren sieben Propranolol-Metaboliten in der Rattenleber und nehmen an, daß die Leber zwar der Hauptort der Verstoffwechselung sei, aber auch Organe wie Lunge und Blut in nicht unbedeutendem Maße daran beteiligt sind. ISHIZAKI et al. (73) fanden insgesamt achtzehn verschiedene Metaboliten dieses Beta-Adrenolytikums, von denen aber bisher nur wenige identifiziert werden konnten.

WALLE et al. (136) weisen nach oraler Dauermedikation im Urin von Mensch und Ratte sowie in Rattenlebermikrosomen einen zu 4-Hydroxy-Propranolol isomeren Metaboliten nach, der mit 12-29% an der Ringhydroxylierung beteiligt ist. WALLE (135) stellt das pharmakologisch aktive Isopropylamin als erstes Beispiel einer 'one-step'-Desaminierung vor. Die Leber scheine der primäre Ort zur Bildung dieser Substanz zu sein, wobei die mikrosomale mischfunktionelle Oxidase oder die mitochondriale Monoaminoxidase eine Rolle spielen. Der Autor beobachtete, daß die isolierte, blutdurchströmte Lun-

ge ebenfalls in der Lage ist, Isopropylamin aus Propranolol zu bilden. Die Ausscheidung dieses Metaboliten erfolge in nicht-konjugierter Form.

FITZGERALD und O'DONNELL (56) berichten, daß das 4-Hydroxy-Propranolol eine ebenso starke pharmakologische Aktivität wie die Muttersubstanz besitzt. CLEVELAND und SHAND (39) stellen bei permanenter oraler Gabe von Propranolol fest, daß die Aktivität der pharmakologisch wirksamen 4-Hydroxy-Verbindung reduziert ist. Offensichtlich wird sie infolge der Sättigung ihres weiteren Stoffwechsels zu einer inaktiven Substanz umgeformt.

Eine beschleunigte Eliminierung von Propranolol bei Nierenerkrankungen wird von THOMPSON et al. (127) beschrieben, konnte aber bis heute nicht erklärt werden. Im Gegensatz hierzu stellen BIANCHETTI et al. (23) ein 7-10faches Ansteigen der Propranololkonzentration im Plasma bei urämischen Patienten fest.

TOCCO et al. (128) fanden für das Timolol eine Eliminationshalbwertszeit von 4-5 Stunden. Da jedoch die Absorption zum Meßzeitpunkt noch nicht beendet schien, ist es wahrscheinlich, daß der ermittelte Wert für die Eliminationshalbwertszeit zu hoch liegt.

Schließlich berichten die Autoren, daß das Verhältnis zwischen renaler und faekaler Ausscheidung nach peroraler Gabe von radioaktiv markiertem Timolol beim Menschen 72:6,5, beim Hund 68:19 und bei der Ratte 58:26 beträgt. Nach intravenöser Applikation eliminieren Ratten 50% der Dosis im Urin und 28% in den Faeces. Beim Hund wird dieser Beta-Blocker fast vollständig metabolisiert. Ein wichtiges Stoffwechselprodukt mit 50% Anteil an der im Urin ausgeschiedenen Radioaktivität wurde als 2-Hydroxy-3-(4-morpholino-1,2,5-thiadiazol-3-yloxy)-propionsäure identifiziert. Im Hundeurin konnten weitere neun Metaboliten mit Hilfe der DC detegiert werden. Im Gegensatz zum Hund erscheinen im menschlichen Urin etwa 20% der zugeführten Radioaktivität als unveränderte Reinsubstanz. Dazu kommen beim Menschen zwei saure Metaboliten mit zusammen 43% und ein basischer mit 5% Anteil an der Radioaktivität. Diese drei Stoffwechselprodukte konnten bisher nicht identifiziert werden, scheinen jedoch weder Milch- noch Essigsäurederivate zu sein. Wechselwirkungen mit Phenobarbital, welches die Eliminationskinetik beeinflussen könnte, wurden nicht festgestellt.

Tabelle 2 zeigt die wichtigsten pharmakokinetischen Daten.

Tabelle 2 : Übersicht der wichtigsten pharmakokinetischen Daten
der in der vorliegenden Arbeit behandelten Beta-Rezeptorenblocker

INN	Absorption T _{max} (h)	Biover- fügbar. (%d.Dos.)	'first- pass' (%d.Dos.)	Distrib.- volumen (l/kg)	Elim. t _{1/2} (h)**	Tot.Elim. im Urin (%d.Dos.)*	Reinsub. im Urin (%d.Dos.)	Literatur
Alprenolol	0,5-1,5	90	10	33	2-3	90	1	(28,29,75, 76,110)
Bunitrolol	0,7-3,0	90	-	-	6,2	50-60	1	(26)
Bupranolol	-	-	-	-	-	-	-	-
Propranolol	1-3	90	30	36	2-3	90	1	(29,52,54, 66,101,113)
Timolol	1-3	90	-	-	4-5	73	20	(77,117,128)

* es handelt sich hierbei um Reinsubstanz und Metaboliten

** nach peroraler Applikation

3.4. Ergebnis der Literaturübersicht

Während für die Substanz Bupranolol weder analytische Literatur noch pharmakokinetische Studien vorlagen, standen für die Beta-Blocker Alprenolol, Bunitrolol, Propranolol und Timolol eine Vielzahl von Veröffentlichungen zur Verfügung.

Von den analytischen Verfahren sind die Farbreaktionen sowie Infrarot- und Kernresonanzspektroskopie als auch die Dünnschichtchromatographie wegen ihrer geringen Spezifität und/oder Empfindlichkeit ungeeignet zum Nachweis von niedrigen Substanzmengen, wie sie nach therapeutischer Dosierung in biologischen Medien vorliegen. Optische Methoden wie UV-Spektroskopie und Spektrofluorimetrie bieten zwar meist die erforderliche Empfindlichkeit, führen aber wegen ihrer geringen Spezifität nur selten zu einer sicheren Identifizierung.

Nur die Gaschromatographie und die radiochemischen Methoden, welche stets mit einem Trennverfahren gekoppelt sind, besitzen die zum Nachweis von therapeutischen Dosen erforderliche Spezifität und Empfindlichkeit im ppm-Bereich. Diese Radio-Tracer-Techniken werden ausschließlich bei Stoffwechseluntersuchungen eingesetzt und bedingen eine nicht unproblematische Strahlenbelastung der Probanden.

Bei den pharmakokinetischen Studien über Beta-Blocker blieben häufig Faktoren wie Applikationsmodus und Dosierungsform unberücksichtigt, obwohl sie den Metabolismus und das kinetische Verhalten dieser Wirkstoffe beeinflussen. Deshalb sind die Resultate dieser Untersuchungen oftmals nicht miteinander vergleichbar. Da die in der Literatur beschriebenen gaschromatographischen Nachweisverfahren für Beta-Adrenolytika nicht geeignet sind, in einem sog. Screening-Verfahren zur gleichzeitigen Identifizierung von mehreren derartigen Substanzen eingesetzt zu werden, ergibt sich als Ziel der vorliegenden Arbeit, eine solche Methode für die gerichtsmedizinische Praxis zu entwickeln.

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die in der Literatur bisher beschriebenen Nachweismethoden gelten in der Regel nur jeweils einer einzelnen Substanz. Deshalb erschien es im Hinblick auf forensisch-toxikologische Aufgaben einer Laborpraxis besonders wichtig, eine schnelle und einfache Methode zu entwickeln, womit mehrere Beta-Rezeptorenblocker selbst nach therapeutischer Dosierung selektiv extrahiert und nachgewiesen werden können.

Für diese Ziele sollte die Brauchbarkeit der Dünnschicht- und vor allem der Gaschromatographie getestet werden, die auch Arzneimittelspuren, wie sie nach therapeutischer Dosierung vorliegen, zu detegieren erlaubt.

Weiterhin mußte ein Extraktionsverfahren gefunden werden, mit dem im ppm-Bereich liegende Wirkstoffmengen selektiv und mit möglichst hoher Wiederfindungsrate erfaßt werden können. Zudem sollte dieses Verfahren auf den Durchschnitt der Beta-Blocker optimiert werden. Wie eingangs bereits erwähnt, waren die Beta-Adrenolytika Alprenolol, Bunitrolol, Bupranolol, Propranolol und Timolol Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Sie enthalten ausnahmslos je eine Ätherstruktur und eine sekundäre Aminogruppe. Timolol besitzt statt der Phenylgruppe einen ebenfalls aromatischen Thiadiazolring. Die Beta-Blocker waren als Reinsubstanzen in Hydrochloridform zugänglich.

4.1. Dünnschichtchromatographie

Von den Beta-Blocker-Salzen wurden wässrige Lösungen der Konzentration 1mg/ml hergestellt, aus denen die Basen freigesetzt wurden. Mit je 15µl (=15µg Beta-Blocker) dieser Lösungen wurden 0,25 mm Kieselgelplatten POLYGRAM^R SIL G/UV₂₅₄ der Firma MACHEREY-NAGEL & CO beschickt. Die Laufhöhe betrug 10cm.

Tabelle 3 zeigt die geprüften Fließmittel sowie ihre Mischungen und Laufzeiten.

Die gefundenen h_{Rf}-Werte sind in Tabelle 4 aufgelistet. Bei dem

Tabelle 3 : Verwendete Fließmittel

Fließm.	Zusammensetzung	Laufzeit (min)	Lit.
1	Chloroform/Aceton 85:15	30-45	(119)
2	Chloroform/Diäthylamin 9:1	45	(17,120)
3	Chloroform/Isopropanol/NH ₃ 70:35:0,7	60	(36)
4	Essigsäure-Isobutylester/Aceton/ n-Butanol/H ₂ O/NH ₃ 50:40:30:6:4	30-45	(119,140)
5	Methanol/NH ₃ 99:1	30	(37,42,96)

Tabelle 4 : Ermittelte hRf-Werte

INN	Handelsname	Fließmittelsysteme				
		1	2	3	4	5
Alprenolol	Aptin	0	0,52	0,44	0,54	0,81
Bunitrolol	Stresson	0	0,32	0,25	0,41	0,38
Bupranolol	Betadrenol	0	0,58	0,38	0,54	0,45
Propranolol	Dociton	0	0,38	0,39	0,51	0,39
Timolol	Temserin	0	0,43	0,44	0,53	0,40

Tabelle 5 : Ergebnisse der Anfärbbarkeit

INN	MARQUIS	DRAGENDORFF	KIEFFER*	HgNO ₃ -Diphenylcarbazon
Alprenolol	violett	orange	blau	-
Bunitrolol	-	orange	-	-
Bupranolol	rosa	orange	blau	-
Propranolol	anthrazit	orange	blau	-
Timolol	grau	orange	blau	-

* Zusammensetzung von KIEFFERs Reagenz auf Morphin :
 Gleiche Teile Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung 1% und
 Eisen(III)-Chlorid-Lösung 10% (143)

Fließmittel Chloroform/Aceton sind alle Beta-Blocker aufgrund ihrer großen Polaritätsunterschiede zum Fließmittel am Auftragsort geblieben.

Die Resultate der Anfärbbarkeit der Beta-Blocker mit den Reagenzien nach MARQUIS, DRAGENDORFF und KIEFFER sowie mit HgNO_3 -Diphenylcarbazon finden sich in Tabelle 5.

Die getesteten Färbemethoden waren sehr unspezifisch und die Auftrennung mit den üblichen Laufmitteln unbefriedigend.

Als entscheidender Nachteil erwies sich jedoch, daß bei einem nach Arbeitsvorschrift VIII extrahierten authentischen Patientenurin aufgrund der geringen Empfindlichkeit der Färbemethoden der dünn-schichtchromatographische Nachweis des gesuchten Beta-Blockers nicht gelang.

4.2. Gas chromatographie

Die Empfindlichkeit der üblichen Färbemethoden für den dünn-schichtchromatographischen Nachweis von Beta-Blockern erwies sich als zu gering. Deshalb wurde die Analytik dieser Substanzen im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage gaschromatographischer Detektion fortgesetzt. Die GC ließ die hohe Empfindlichkeit erwarten, wie sie für Pharmakakonzentrationen nach therapeutischer Dosierung notwendig ist.

4.2.1. Bemerkungen zur Problematik der Gaschromatographie

Um einen kurzen Einblick in die Problematik der GC zu vermitteln, wird an dieser Stelle auf die wichtigsten Parameter dieser Analysetechnik eingegangen.

Die Wahl des Detektors nimmt wesentlichen Einfluß auf Spezifität und Empfindlichkeit des Nachweises. Im folgenden sind einige Grund-

typen von Detektoren und deren Funktionsweise beschrieben. Der Flammenionisationsdetektor (FID) spricht grundsätzlich auf alle Substanzen mit mindestens einer CH-Gruppe an und besitzt daher eine relativ geringe Spezifität. Er wird deshalb am häufigsten zur Spurenanalyse eingesetzt. Seine Signalgröße 'S' ist geschwindigkeitsbezogen nach der Grundgleichung $S_2 = a_2 \cdot v_i$ ($v_i = g/sec$), d.h. abhängig von der pro Zeiteinheit den Detektor passierenden Substanzmenge.

Der Electron Capture Detector (ECD) reagiert nach v. MEYER und HAUCK (93) auf alle elektroneneinfangenden Verbindungen wie Halogene, elementaren Sauerstoff, sauerstoffhaltige Gruppen, Bleialkyle, kondensierte Aromaten, Substanzen mit Schwefel oder Nitrogruppen und Mehrfachbindungen. Die Signalgröße ist ebenfalls geschwindigkeitsabhängig.

Der Thermionic Detector (TID) spricht im Prinzip auf alle mit der LASSAIGNE-Probe nachweisbaren Elemente an. Nach AUE et al. (14) ist seine Selektivität beeinflusst vom Alkalisalz der Kristallperle, der geometrischen Anordnung, dem Trägergas, den Brenngasen und der Temperatur. Durch den Rubidiumchlorid-Kristall und entsprechende Wahl der Brenngasströmungen lassen sich nach v. MEYER (92) stickstoffhaltige Verbindungen mit guter Selektivität (N/C 1:5000) und etwa gleicher Empfindlichkeit nachweisen, da die Anzeige nicht von der Struktur, sondern lediglich vom N-Äquivalent abhängig ist.

Der in dieser Arbeit verwendete NP-FID entspricht in seiner Wirkungsweise in etwa dem TID. Beide Detektoren funktionieren geschwindigkeitsabhängig im Gegensatz zu dem heute seltener gebrauchten Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD). Dieser besitzt eine konzentrationsabhängige Wirkungsweise nach der Grundgleichung $S_1 = a_1 \cdot c_i$ und spricht auf Alkane, Alkene und primäre Alkoholgruppen an.

Die Säulen sind in den Materialien Edelstahl, Kupfer, Aluminium und Glas erhältlich. Für die Analyse nichtreaktiver Substanzen wie Ester wird häufig eine Stahlsäule gewählt. Bei der Untersuchung von Proben, deren Moleküle zur Wasserstoffbrückenbildung fähig sind, sollte unbedingt das inerte Glas bevorzugt werden.

Bezüglich der Ausmaße der Säule ist z.B. bei Substanzen mit hohem Molekulargewicht darauf zu achten, daß Länge und Innendurchmesser gering gehalten werden. Damit werden zu lange Retentionszeiten vermieden.

Meist setzen sich Säulenpackungen aus einem hochporösen, feinkörnigen Trägermaterial und einer organischen, polymeren Beschichtung (Phase) zusammen, die sich bei Arbeitstemperaturen im flüssigen Zustand befindet und je nach ihren Polaritätseigenschaften die Probenbestandteile in unterschiedlichem Maße adsorbiert. Es handelt sich daher strenggenommen um eine Gas-Flüssigkeits-Chromatographie.

Als Grundlage der meisten Trägermaterialien wurden zwei Arten von Diatomeenerde gewählt, die sich in der Helligkeit ihrer Farbe unterscheiden. Sie werden in verschiedenen Korngrößen und Oberflächenbehandlungen angeboten. Die meistgebrauchte Variante besitzt einen Partikeldurchmesser von $177\text{--}149\mu\text{m}$ (80–100 mesh). Darüber hinaus gibt es noch eine gröbere Modifikation mit $250\text{--}177\mu\text{m}$ (60–80) und eine feinere mit $149\text{--}125\mu\text{m}$ (100–120 mesh) als trennwirksamste Stufe.

Die chemische Passivität der Oberfläche und die Struktur des Trägermaterials haben großen Einfluß auf die Qualität eines Chromatogramms. Deshalb werden die Trägermaterialien häufig durch Spezialbehandlungen mit Dimethyl-Dichlor-Silan (DMCS) inaktiviert, um eine Adsorption von Proben mit funktionellen Gruppen wie OH- oder NH₂- zu vermeiden.

Die stationäre Phase besteht aus höchst vielfältig substituierten Polymeren wie Squalan, Polyäthylenglycolen, Silikon- oder Apiezonfetten. Bei ihrer Wahl ist darauf zu achten, daß sie den thermischen Anforderungen genügen, die u.a. durch die Siedepunkte der Proben determiniert sind. Allgemein gilt, daß eine Phase ähnliche Polaritätseigenschaften wie die zu untersuchenden Proben haben sollte. Chromatogramme guter Qualität lassen sich also z.B. mit einer Carbowax-Phase für die Trennung von Alkoholen, mit Polyester für Ester oder Apiezon für Kohlenwasserstoffe erreichen.

Um bei der Fülle in Frage kommender Phasen eine gezielte Auswahl treffen zu können, haben ROHRSCHEIDER (112) und später McREYNOLDS (91) Datensysteme in Umkehrung der Theorie der Retentionsindices (RI) nach KOVATS (83) entwickelt, womit jede einzelne Phase durch eine Reihe bestimmter Werte charakterisiert werden kann. Diese Wer-

te lassen Rückschlüsse auf das Polaritätsverhalten der zugehörigen Phase gegenüber verschiedenen repräsentativen Substanzen aus bestimmten Stoffgruppen bezüglich einer definierten Squalanphase bei identischen Bedingungen von 100°C Ofentemperatur und 20% stationärer Phase auf Chromosorb W,AW zu. Tabelle 6 zeigt die fünf von ROHRSCHEIDER gewählten Stoffgruppen mit Referenzsubstanzen. Ein einzelner ΔI -Wert resultiert aus der Differenz der RI von z.B. Nitropropan auf zu bestimmender Phase und Squalanphase. Dieser ΔI -Wert ist indirekt proportional zum Polaritätsunterschied der getesteten Phase zu Nitropropan. Von jeder Stoffgruppe wird eine Bezugssubstanz bestimmt und der zugehörige ΔI -Wert gebildet. Die Summe aller ΔI -Werte ist dann proportional zum Polaritätsunterschied der in Frage kommenden Phase zu Squalan.

Voraussetzung für die Wahl einer geeigneten Phase ist schließlich die Analyse der chemischen Struktur der Testmoleküle entsprechend Tabelle 6. Meist enthalten größere Moleküle sowohl elektronenziehende wie -abstoßende Elemente. Hier gilt es, den dominierenden Effekt zu ermitteln. Dann muß eine Phase gefunden werden, bei der die den Probesubstanzen am besten entsprechenden Stoffgruppen die höchsten ΔI -Werte aufweisen. Zur Trennung gesättigter und ungesättigter Fettsäureester würden beispielsweise Phasen auf der Basis hoher $x\text{-}\Delta I$ -Werte (Olefine) ausgesucht, da diese Werte gute Polaritätsübereinstimmung zwischen Proben und Phase bedeuten.

Zur Konzentration der stationären Phase auf dem Trägermaterial wäre zu erwähnen, daß diese proportional ist zu den Retentionszeiten der Testsubstanzen bei konstanter Säulentemperatur. Um die Retentionszeiten in Grenzen zu halten, sollten deshalb Substanzen hohen Molekulargewichts mit 1-2% beschichteten Trägermaterialien getrennt werden anstatt der üblichen Beschichtung von 3-10%.

Folgende Kriterien sind bei der Wahl der günstigsten Ofen- oder Säulentemperatur zu beachten :

Wird die Thermostabilitätsgrenze der Phase erreicht, werden bei dieser Temperatur bereits flüchtige Bestandteile der Phase vom Trägergas eluiert. Dies zeigt sich im Chromatogramm als Ansteigen der Basislinie und wird als " Säulenbluten " bezeichnet. Je mehr das Temperaturlimit überschritten wird, desto stärker " blutet " die Säule und wird infolgedessen unbrauchbar.

Tabelle 6 : Stoffgruppen mit Referenzsubstanzen nach ROHRSCHEIDER

ΔI -Symbole	x	y	z	u	s
Stoffgruppen	Intermolekular-	Elektronen-	Elektronen-	Komplex-	Komplex-
Beispiele	Aromate (Benzol) Olefine	Alkohole (1-Butanol) Nitrile Carbonsäuren -CHCl ₂ -CCl ₃ -CH ₂ Cl -NO ₂	Ketone (Methyl- äthylketon, 2-Pentanon) Äther Aldehyde Ester Epoxide -N(CH ₃) ₂	Nitrome- than Nitropro- pan	Pyridin Dioxane

Wenn jedoch die Ofentemperatur zu tief gewählt wird, verbreitern sich die Peaks, und die Retentionszeiten erhöhen sich bis zum Verbleiben der Substanzen in der Säule. Absolutes unteres Kriterium für die Elution sind die Schmelzpunkte der stationären Phasen. Bei Verbindungen mit hohen Schmelzpunkten werden besondere Ansprüche an die Thermostabilität einer Säulenpackung gestellt.

Soll ein Spektrum von verschiedenen Testsubstanzen mit bei isothermen Bedingungen stark differierenden Retentionszeiten untersucht werden, besteht die Möglichkeit, durch ein Temperaturprogramm mit präzise wählbarer Heizrate die Retentionszeitdifferenzen zu reduzieren.

Die Temperatur des Detektors sollte so weit über der Säulentemperatur und damit den Siedepunkten der Proben gewählt werden, um Kondensationsvorgänge an der Detektorinnenwand zu vermeiden. Die Injektorblocktemperatur muß ebenfalls in diesem Bereich liegen, um ein sofortiges Verdampfen der injizierten Substanzen zu gewährleisten.

Da unbenutzte Säulenpackungen noch besonders flüchtige Teile der stationären Phase und Spuren des herstellungstechnischen Lösungsmittels enthalten, ist es notwendig, eine frisch gefüllte Säule innerhalb von ca. zehn Stunden unter Trägergasstrom von Zimmer- auf Betriebstemperatur zu erwärmen. Durch diesen Konditionierungsvorgang werden die sonst im Chromatogramm störenden Partikel ausgewaschen.

Wenn ein Teil der Testsubstanzen während des Säulendurchgangs neben der physikalischen Absorption auch chemischen Wechselwirkungen unterliegt, wird er verzögert eluiert und erzeugt eine Peakasymmetrie in Form von Tailing, dessen Ursache und Vermeidung im folgenden dargestellt werden :

Zum einen werden reaktive Testsubstanzen häufig an der Innenfläche von Stahlsäulen adsorbiert. Stearate z.B. erfordern die Verwendung einer inerten Glassäule.

Zum anderen können NH_2 - oder OH-Gruppen-enthaltende Moleküle, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigt sind, von reaktiven Bestandteilen der Trägermaterialoberfläche gebunden werden. Die Unterdrückung dieses Effekts wird erreicht, indem man

- die reaktiven Teile der Testmoleküle z.B. durch Veresterung der OH-Gruppen mit Monocarbonsäureanhydriden wie ESA

(Essigsäureanhydrid), PSA (Propionsäureanhydrid) oder BSA (Buttersäureanhydrid) inaktiviert.

- das Trägermaterial durch Säuren- oder Basenbehandlung von den mineralischen Unreinheiten befreit. Falls das Trägermaterial mit einer polaren Phase vom Polyestertyp beschichtet wird, empfiehlt sich zur Tailing-Reduktion das sog. 'acid-washing' des Trägermaterials, obwohl diese Behandlung allein keine ausschlaggebende Verbesserung bringt.
- besondere Modifizierungen der Trägermaterialoberfläche z.B. durch Silanisierung durchführt. Am besten hat sich dafür die Behandlung mit Dimethyl-Dichlor-Silan (DMCS) bewährt.
- die reaktiven Teile der Trägermaterialoberfläche mit der stationären Phase abdeckt. Dazu muß die Belegung hoch sein. In diesem Fall ist eine Silanisierung nicht mehr nötig. Für basische Proben wie Amine kann zur Inaktivierung des Trägermaterials eine stationäre Phase wie Polyäthylenimin Verwendung finden. Eine weitere Möglichkeit besteht auch darin, 1-2% KOH der Phase beizumischen.

Die Auswahlkriterien für eine Phase nach ROHRSCHEIDER (112) und McREYNOLDS (91) wurden bereits erläutert. Bei einer nach dieser Methode ausgesuchten Phase sind ungünstige Wechselwirkungen weitgehend auszuschließen, wenn sich Proben und stationäre Phase in ihrem Polarisitätsverhalten bestmöglich entsprechen und deshalb kaum chemische Bindungen selbst polyfunktioneller Testmoleküle auftreten können. Eine weitere Ursache für Tailing und Retentionszeitverfälschungen liegt in den Verunreinigungen des Glaswattestopfens am Injektorende der Säule. Diese stammen u.a. aus Rückständen von Urinextraktionen, lösen sich gelegentlich wieder aus der Glaswatte und rufen im Chromatogramm "Rauschen" oder sogar artifizielle Peaks hervor. Deshalb ist eine Erneuerung dieser Glaswatte in gewissen Abständen erforderlich.

4.2.2. Allgemeine gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Für sämtliche Untersuchungen wurde ein Gaschromatograph HP 5830 A der Firma HEWLETT-PACKARD verwendet. Ferner stand ein Zusatzgerät

für den NP-FID sowie ein automatischer Probengeber zur Verfügung. Da allen Beta-Blockern eine sekundäre Aminogruppe zueigen ist, entschied man sich für den selektiv stickstoffempfindlichen NP-FID Nr.18847 A der Firma HEWLETT-PACKARD, der nach dem Prinzip eines TID arbeitet. Es wurde statt des gebräuchlichen Stickstoffs Helium als Trägergas eingesetzt, dessen Strömungsgeschwindigkeit auf den konstanten Wert von 20ml/min eingestellt wurde. Nach v.MEYER (92) besitzt Helium den Vorteil, daß die Peakhöhen N-haltiger Substanzen bei Verwendung dieses Trägergases im Vergleich zu Stickstoff auf mehr als das Doppelte ansteigen. Der "Nitrogen Phosphorous Flame Ionisation Detector" ist mit einem elektrisch heizbaren und im geometrischen Zentrum des Kollektors angeordneten RbCl-Keramikzylinder ausgestattet. Obwohl keine Flamme gezündet wird, entsteht bei relativ niedriger Temperatur um diesen Zylinder ein Plasma, das der Ausrichtung der Ionen und der Dissoziation von organischen Molekülen dient. P- und N-haltige Substanzen bedingen dabei eine enorme Steigerung der Leitfähigkeit dieses Plasmas bis zu einer im Picogrammbereich liegenden Empfindlichkeit (144).

Die üblichen Detektorgase Wasserstoff und Luft mußten den jeweiligen Empfindlichkeitsanforderungen gemäß zwischen 3,0-4,5 bzw. 50-60ml/min eingestellt werden. Die Temperatur des Injektorblocks bzw. des Detektors betrug 250 bzw. 300°C.

Für die Bestimmung der Retentionsindices nach KOVATS (83) in Kapitel 4.6. mußte allerdings ein konventioneller FID verwendet werden, da definitionsgemäß n-Alkane als Bezugssubstanzen detegiert werden sollten. Bei diesem Detektor waren die Brenngase H_2 und Luft auf 40 bzw. 200ml/min zu erhöhen.

Um störende Wechselwirkungen zwischen Beta-Blockern und Säulenwand zu vermeiden, entschied man sich für Glassäulen mit 4ft Länge, 2mm Innendurchmesser und 6" Endenabstand zur 'on column injection'. Das Material Glas erlaubt aufgrund seiner Durchsichtigkeit eine genaue Kontrolle von Menge und Dichte der Säulenpackung.

4.2.3. Auswahl der Packungen und Programme

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Auswahl geeigneter Packungen keineswegs rein empirisch. Unter Berücksichtigung der McREYNOLDSschen Daten (91), die auf der Theorie von ROHRSCHEIDER (112) basieren,

wurde die Brauchbarkeit von sechs im folgenden beschriebenen Säulenpackungen überprüft, deren Charakteristika in Tabelle 7 zusammengefaßt sind.

ULTRABOND ist ein neuartiges, besonders zeitaufwendig hergestelltes Produkt der Firma ALLTECH ASSOCIATES (9). Das Trägermaterial wird vor der Belegung mit Carbowax 20m mehrere Tage mit kochender Salzsäure gewaschen, daraufhin unter Stickstoff-Umspülung erhitzt und zuletzt mehrere Tage mit Methanol extrahiert. Auf diese Weise bedeckt eine ultradünne Carbowax-Phase vollständig das Trägermaterial Chromosorb W. Die so gewonnene ULTRABOND-Packung soll nach Angaben des Herstellers nur sehr geringes Säulenbluten, hohe Selektivität, kurze Retentionszeiten, hohe thermische Stabilität und ausgezeichnete Trenneigenschaften auch bei stark polaren Substanzen aufweisen.

2% OV101 stellt eine bewährte, universell verwendbare Methylsilikonphase auf Chromosorb W, HP dar und besitzt ähnliche Polaritätseigenschaften wie die bekannte Säulenpackung OV1.

10% APIEZON L/2% IGEPALE ist eine relativ hochkonzentrierte Hydrocarbonphase. Als Trägermaterial fungiert Chromosorb W, HP, das zur Verbesserung der Elutionseigenschaften bei basischen Substanzen mit 10% KOH behandelt wurde. Apiezon findet gewöhnlich bei Amphetaminen und verwandten Verbindungen Anwendung. Igepal reduziert Adsorptionstendenzen und führt deshalb zur Verminderung von Tailing.

3% OV225 besteht aus einer hochpolaren Cyanopropyl-Phenylmethyl-Silikonphase mit einem Temperaturlimit von 275°C auf Gas Chrom Q. Diese Packung ist gut brauchbar zur Chromatographie von Basen.

3% SP2100 B ist eine reine Methylphenyl-Silikonphase, stark unpolar und vergleichbar mit OV1, OV101 und SE30. Das Trägermaterial Supelcoport AW wurde mit DMCS inaktiviert, die Phase basenmodifiziert, sodaß die Packung für die Analytik von Steroiden und Alkaloiden eingesetzt werden kann.

1% SP1000 ist eine Polyäthylenglycolphase hoher Polarität mit substituierter Terephthalsäure auf Supelcoport. Sie wird zur Trennung sowohl von Säuren als auch Basen und Alkoholen benutzt.

Weiterhin war die Brauchbarkeit eines Temperatur- bzw. Isotherm-Programmes zu überprüfen.

Für diese Untersuchungen wurden je 2 µl äthanolischer Beta-Blocker-Lösungen der Konzentration 10 µg/ml auf die einzelnen Säulen gege-

ben. Ein Temperaturprogramm im Bereich 120-230°C mit einer Heizrate von 8°C/min wurde auf den Phasen 3% SP2100 DB und ULTRABOND erprobt.

In Tabelle 8 finden sich Packungen, Programme, Retentionszeiten und Peakqualitäten dieser Untersuchungen zusammengefaßt. Bei der Phase 10% APIEZON L/2% IGEPAL konnten die Beta-Blocker aufgrund der hohen Belegung bei den gewählten Temperaturbedingungen nicht eluiert werden.

In Abb. 1 werden am Beispiel des Beta-Blockers Bunitrolol charakteristische Chromatogramme für die getesteten Packungen miteinander verglichen.

Die Peakqualität der Packungen ULTRABOND und 2% OV101 erwies sich bei einigen Beta-Blockern als unzureichend. Da es Aufgabe dieser Untersuchung war, ein möglichst großes Spektrum an Beta-Blockern zu erfassen, wurde auf die Verwendung der beiden Phasen verzichtet.

Die Elutionseigenschaften der Packungen ULTRABOND und 3% SP2100 DB wurden zusätzlich bei dem oben angegebenen Temperaturprogramm geprüft. Sie erbrachten jedoch keine besseren Resultate als unter isothermen Bedingungen, ließen sogar während der Heizperiode ein auffallendes Ansteigen der Basislinie erkennen, was auf eine temperaturabhängige Schädigung der Packung im Sinne des "Säulenblutens" zurückzuführen sein mag. Abb. 2 demonstriert dies an einem Vergleich der Chromatogramme des Beta-Blockers Bunitrolol auf ULTRABOND bei 120-230°C und 200°C isotherm.

Da die getesteten Beta-Blocker ohnehin ähnliche Strukturen und folglich auch ein geringeres Retentionszeitspektrum aufweisen, konnte auf ein Temperaturprogramm verzichtet werden. Deshalb wurde für die weiteren Arbeiten die Isothermie bevorzugt, die zudem den labortechnisch bedeutenden Vorteil der Material- und Zeitersparnis besitzt, da Heiz- und Abkühlperiode entfallen.

4.2.4. Erzielte Trennungen

Die Trennfähigkeit und Peakqualität der Packungen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 für Beta-Blocker-Reinsubstanzen sind zufriedenstellend. Die Trenneigenschaften dieser stationären Phasen werden in den Abb. 3-5 dargestellt.

Tabelle 8 : Übersicht der Programme, Phasen, Retentionszeiten und Peakqualitäten

Programm-Nr.	ULTRABOND		2% OV101		10% APIEZON L/ 2% IGEPAL		3% SP2100 DB		3% OV225		1% SP1000	
	200°C iso		120-230°C		200°C iso		200°C iso		120-230°C		220°C iso	
	1	2	3	4	5	6	7	8				
Alprenolol	0,83	7,15 T	1,75 T	-	1,68	8,35	1,48	1,76				
Bunitrolol	2,52 T	10,43 T	2,52 T	-	2,68	10,05 T	4,93	6,03				
Bupranolol	1,17	8,13 T	2,44 T	-	2,27	9,41	2,25	2,60				
Propranolol	4,62 T	11,98 T	5,24 T	-	5,34	12,47	6,75	10,40				
Timolol	6,24 T	12,68 T	8,03 T	-	8,20	13,65	10,87	14,75				

T Tailing

Abb. 1 : Vergleich der Chromatogramme von Bunitrolol auf den in Tabelle 8 vorgestellten Phasen bei isothermen Temperaturbedingungen

Gerät	HP 5830 A
Detektor	NP-FID, Spannung 18V
Trärgas	He (20 ml/min)
Detektorgase	H ₂ (3,0ml/min)
	Luft (55 ml/min)
Ofentemp.	200 bzw. 220°C (s.Tab.8)
Injektortemp.	250°C
Detektortemp.	300°C
Papiervorschub	0,5 cm/min

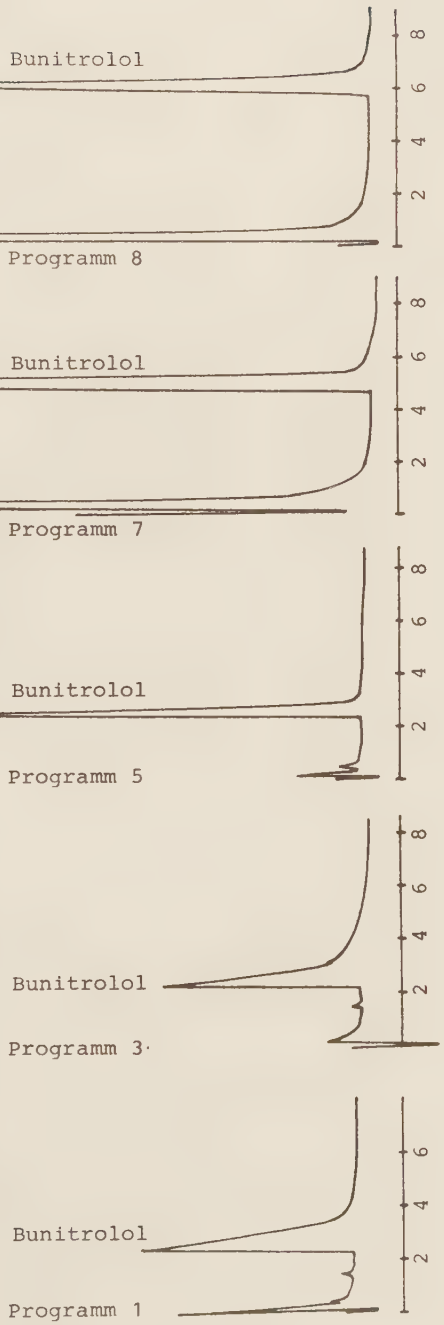


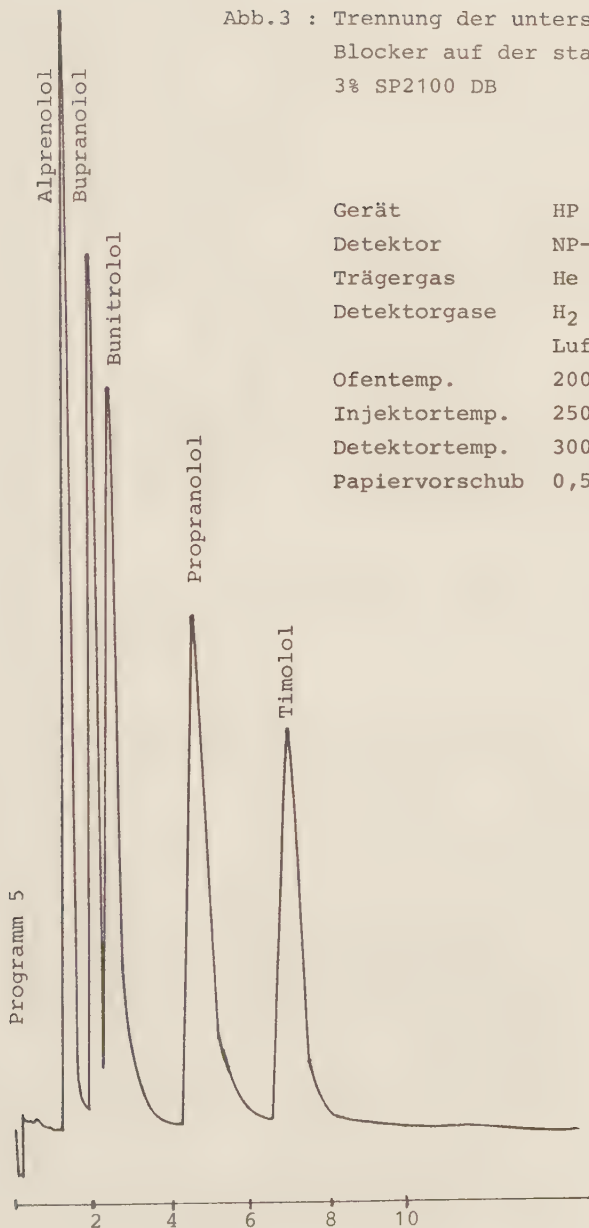
Abb.2 : Vergleich der Chromatogramme des Beta-Blockers
Bunitrolol auf der stationären Phase ULTRABOND
bei Temperatur- und Isothermprogramm



Gerät	HP 5830 A
Detektor	NP-FID, Spannung 18V
Trärgas	He (20 ml/min)
Detektorgase	H ₂ (3,0ml/min)
	Luft (55 ml/min)
Ofentemp.	120-230°C, Heizrate 8°C/min; 200°C iso
Injektortemp.	250°C
Detektortemp.	300°C
Papiervorschub	0,5 cm/min



Abb.3 : Trennung der untersuchten Beta-Blocker auf der stationären Phase 3% SP2100 DB



Gerät	HP 5830 A
Detektor	NP-FID, Spannung 18V
Trärgas	He (20 ml/min)
Detektorgase	H ₂ (3,0ml/min)
	Luft (55 ml/min)
Ofentemp.	200°C
Injektortemp.	250°C
Detektortemp.	300°C
Papiervorschub	0,5 cm/min

Abb. 4 : Trennung der untersuchten Beta-Blocker
auf der stationären Phase 3% OV225

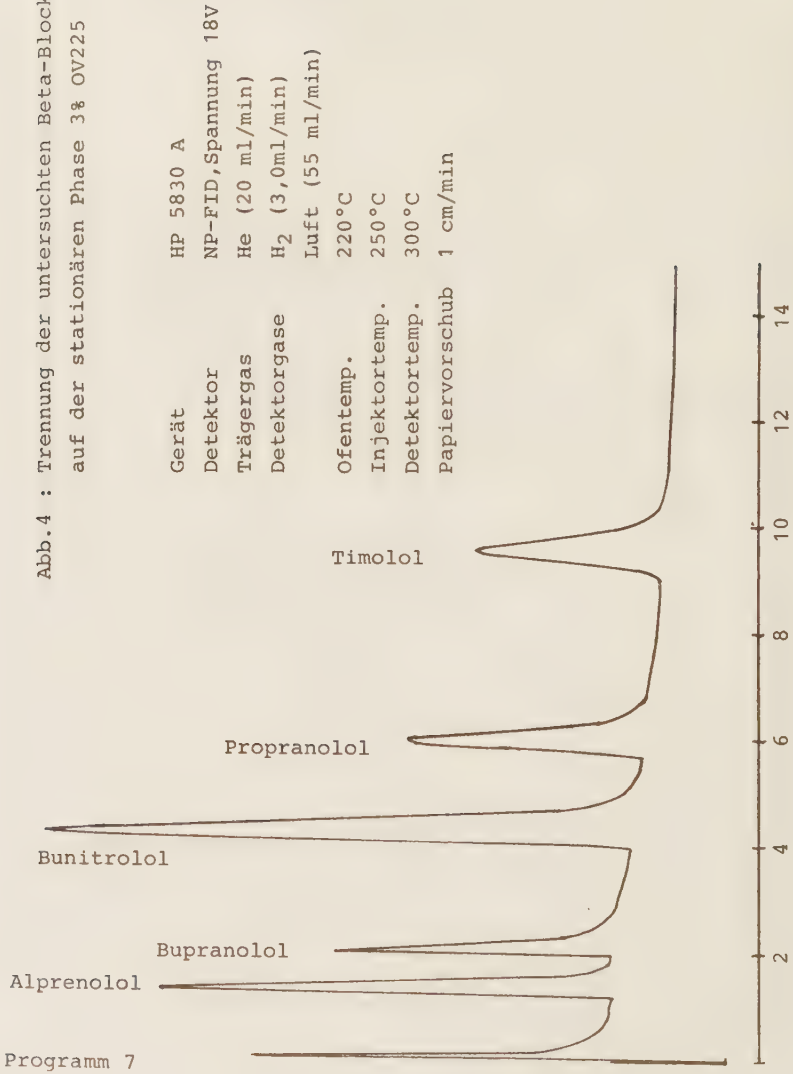
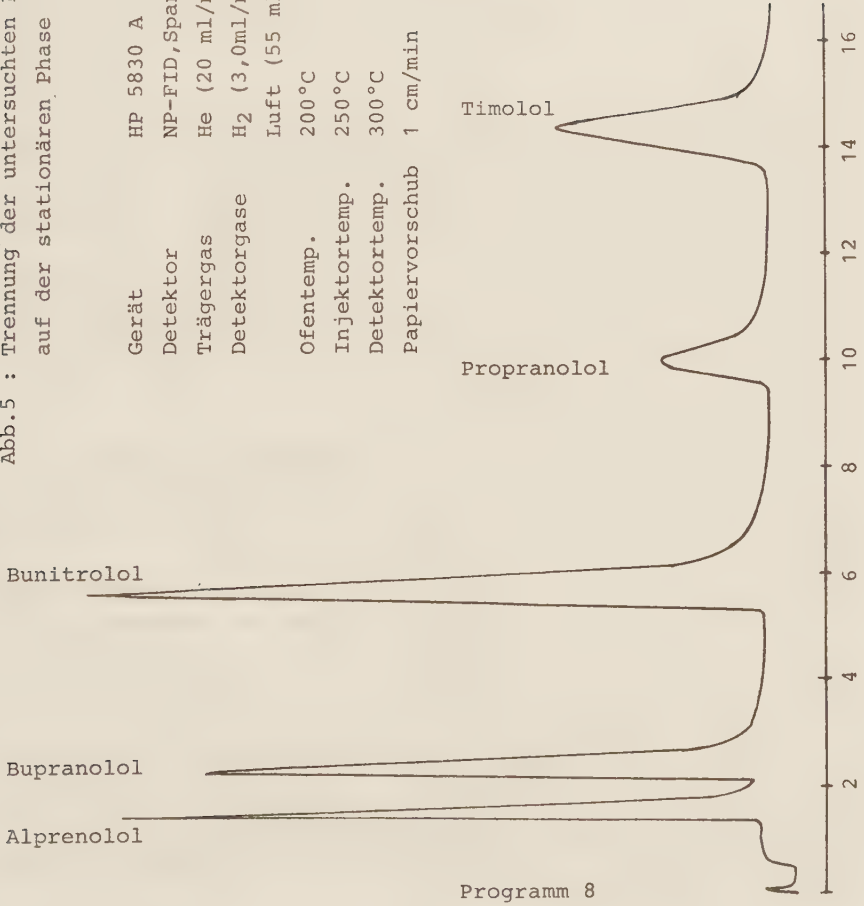


Abb.5 : Trennung der untersuchten Beta-Blocker
auf der stationären Phase 1% SP1000



4.3. Untersuchungen zur Derivatisierung

Bereits die Grundstruktur aller Beta-Blocker weist reaktionsfähige Gruppen auf, die Adsorptionseffekte und damit Peakasymmetrien zur Folge haben können. BROOKS und HORNING (32) schlugen bereits im Jahre 1964 eine Lösung dieses Problems vor, indem sie z.B. alkoholische Gruppen vor der gaschromatographischen Analyse mit kurzketigen Monocarbonsäuren zu verestern empfehlen.

Analog KAUERT (78) wurden nach Arbeitsvorschrift I die alkoholischen und Aminogruppen mit Propionsäureanhydrid (PSA) substituiert, da diese Derivatisierung im wässrigen Milieu und damit direkt im Urin durchführbar ist. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde ebenfalls eine Nachderivatisierung mit PSA und Pyridin angeschlossen.

Die Derivatbildung erbrachte auf den Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 keine deutlichen Verbesserungen der Peaksymmetrie im Vergleich zu den Reinsubstanzen, was Abb. 6 auf 3% SP2100 DB und Abb. 7 auf 3% OV225 in Gegenüberstellung des Beta-Blockers Bunitrolol und seines PSA-Derivats aufzeigen.

Ferner wurden derartige Beta-Blocker-Abkömmlinge bei Temperaturprogramm auf den stationären Phasen 3% SP2100 DB und ULTRABOND untersucht. Es konnten dabei lediglich die bereits beschriebenen Eigenschaften des Temperaturprogramms beobachtet werden.

Eine Analyse von Derivaten bei Isothermprogramm auf ULTRABOND bewies jedoch, daß eine PSA-Umsetzung in diesem Fall durchaus beachtliche Verbesserungen der Peakqualität bedingt, in der Regel aber die Ergebnisse mit Reinsubstanzen auf den stationären Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 oder 1% SP1000 nicht übertroffen werden.

Da die Derivatisierung einen erhöhten labortechnischen Aufwand bedeutet, wurde deshalb weiterhin auf diesen Arbeitsgang verzichtet. Zur Sicherung der Identifizierung von Beta-Blockern ist dieses Verfahren, insbesondere bei Verwendung einer für Reinsubstanzen ungünstigeren Packung, durchaus brauchbar.

Abb.6 : Vergleich der Chromatogramme des
PSA-Derivats des Beta-Blockers
Bunitrolol und der Reinsubstanz
auf der Phase 3% SP2100 DB

Gerät HP 5830 A
Detektor NP-FID, Spannung 18V
Trärgas He (20 ml/min)
Detektorgase H₂ (3,0ml/min)
Luft (55 ml/min)
Ofentemp. 200°C
Injektortemp. 250°C
Detektortemp. 300°C
Papiervorschub 0,5 cm/min

Bunitrolol

Programm 5



Bunitrolol-PSA-Derivat

Programm 5

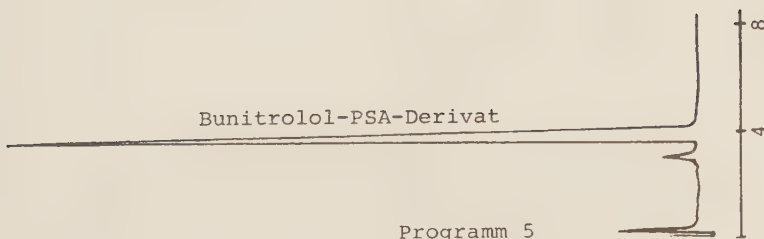
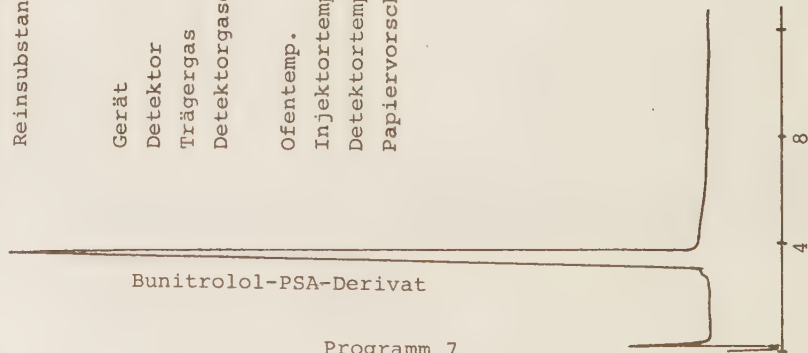


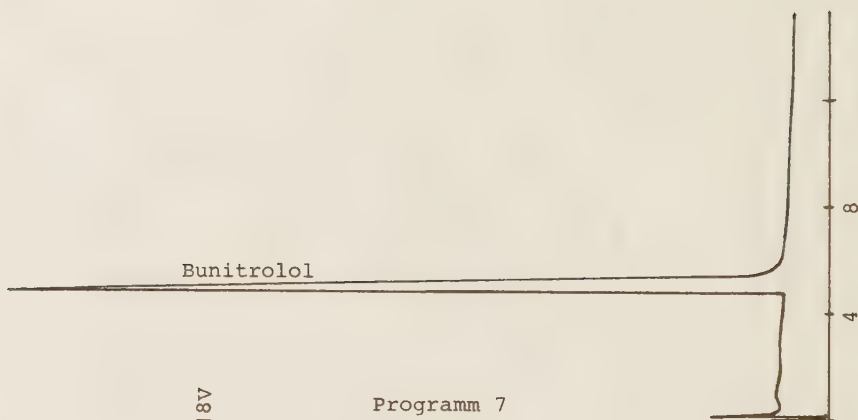
Abb.7 : Vergleich der Chromatogramme des
Bunitrolol-PSA-Derivats und der
Reinsubstanz auf 3% OV225

Gerät	HP 5830 A
Detektor	NP-FID, Spannung 18V
Trägergas	He (20 ml/min)
Detektorgase	H ₂ (3,0ml/min)
	Luft (55 ml/min)
Ofentemp.	220°C
Injektortemp.	250°C
Detektortemp.	300°C
Papiervorschub	0,5 cm/min

Programm 7



Programm 7



4.4. Untersuchungen zum Nachweis von Beta-Blockern in biologischen Flüssigkeiten

Nachdem die bisher beschriebenen Studien brauchbare Bedingungen zur gaschromatographischen Analyse von Beta-Blockern lieferten, konnte nun versucht werden, Beta-Blocker aus biologischem Medium zu isolieren.

Nach Angaben der Literatur sind die Beta-Blocker beim Menschen im allgemeinen innerhalb von 24 Stunden nach Verabreichung radioaktiv markierter Substanz beinahe zu 100% der Radioaktivität im Urin wiederzufinden. Dabei liegen sie zum Großteil als Hydroxy- und/oder Glucuronid-Verbindungen vor. Nur ein Bruchteil von weniger als 1% der Dosis wird in unmetabolisierter Form ausgeschieden.

Im Blutplasma finden sich fast ausschließlich Reinsubstanzen, die z.T. einer Proteinbindung unterliegen. So ergibt sich durchschnittlich eine zehnfach niedrigere Konzentration an Beta-Blocker - Reinsubstanz im Plasma im Gegensatz zum Urin. Ferner beinhaltet das biologische Medium Blut die Probleme der bereits erwähnten Proteinbindung der Beta-Adrenolytika und der zeitabhängigen starken Schwankungen ihrer ohnehin geringen Konzentrationen.

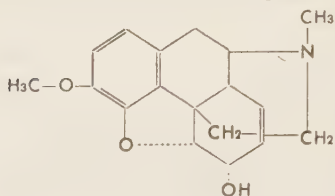
Deshalb entschloß man sich, die Beta-Blocker aus Urin zu extrahieren. Für alle Ausschüttelverfahren nach den Arbeitsvorschriften II-VII stand pharmakafreier Normalurin zur Verfügung, der mit 1n HCl zur Konservierung auf pH 3 eingestellt war.

4.4.1. Wahl des internen Standards

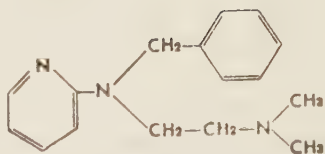
Codeinphosphat (INN) erschien wegen seines hohen Molekulargewichts und seiner ausgeprägten Polarität bei der gewählten Temperatur nicht auf der stationären Phase 3% SP2100 DB.

Tripelenamin, ein Antihistaminikum der Äthylendiaminreihe, weist geringere Polarität und kleineres Molekulargewicht auf, sodaß seine Retentionszeit beim Durchschnitt der Beta-Blocker liegt, wie es für

interne Standards allgemein empfohlen wird.



Codein (INN)



Tripelenamin (INN)

In den Versuchen unter Punkt 4.4.3. diente Tripelenamin generell als interner Standard. Für die weiteren Untersuchungen einschließlich Kapitel 4.4.4. wurden in den Fällen, wo sich Tripelenamin- und Beta-Blocker-Peak überlagern würden, andere Beta-Blocker als Standardsubstanzen gewählt. So diente für Bunitrolol das Bupranolol als interner Standard und umgekehrt.

4.4.2. Arbeitsbedingungen

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf der Phase 3% SP2100 DB durchgeführt. Die Ofentemperatur betrug 180°C. Weitere Angaben sind den allgemeinen gaschromatographischen Bedingungen in Kapitel 4.2.2. zu entnehmen.

4.4.3. Untersuchungen zur selektiven Extraktion von Beta-Blockern aus Urin

Voraussetzung für den gaschromatographischen Nachweis von Beta-Blockern im Urin ist eine möglichst selektive Extraktion dieser Wirkstoffe.

4.4.3.1. Extraktion mit AMBERLITE XAD-2 - Austauscherharz

Die XAD-2- Säulen bestehen aus einem nicht-ionogenen, auf der Basis VAN DER WAALSscher Kräfte wirkenden Austauscherharz und werden meist als 'drug screen'-System verwendet. Wie in Arbeitsvorschrift II

beschrieben, wurden die vorher in der Konzentration von je $10\mu\text{g/ml}$ zugesetzten Beta-Blocker und Tripelenamin aus Urin extrahiert. Das XAD-2 -Austauscherharz wies als 'screening'-System keine Selektivität für Beta-Blocker auf, sodaß ein sehr hoher Prozentsatz an störenden Urinbestandteilen mitextrahiert wurde. Trotz z.T. guter Ausbeuten an Beta-Blockern erschienen im Chromatogramm zahlreiche Überlagerungen bis zur Undefinierbarkeit mancher Beta-Blocker-Peaks. Abb. 8 demonstriert dies für die Extraktion von Bupranolol. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß Tripelenamin mit einer Retentionszeit von 5,4 min (bei 180°C) nicht im Chromatogramm auffindbar ist, was darauf beruhen könnte, daß Tripelenamin durch mitextrahierte Verunreinigungen überlagert worden ist. Standard nicht auszuwaschen vermag.

4.4.3.2. Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol (1)

Nachdem Urinextraktionen mit XAD-2 - 'drug screen'-System ungeeignet waren, wurde analog v. MEYER (92) ein Extraktionsgang auf der Basis von Petroleumbenzin/2-Methylbutanol (1)-Mischungen entwickelt. WALLE und EHRSSON (133) sowie DILL und GLAZKO (44) setzten bereits dem Extraktionsmittel eine geringe Menge Alkohol zu, um die sonst drohende irreversible Adsorption der zu extrahierenden Substanzen an der Reagenzglaswand zu vermeiden. Da Beta-Blocker relativ polar sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Menge an Methylbutanol auf 5% erhöht.

Die nach Arbeitsvorschrift III gewonnenen Chromatogramme repräsentiert Abb. 9 am Beispiel des Beta-Blockers Bupranolol. Hier zeigt sich eine auffallende Selektivität dieser Extraktionsmethode für Beta-Blocker, wie dies auch v. MEYER (92) bei Antihistaminika feststellen konnte.

4.4.4. Versuche zur Optimierung der Ausbeute

Mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol (1) stand nun ein brauchbares Extraktionsmittel für Beta-Blocker zur Verfügung. Die nächste Aufgabe bestand darin, Extraktionsbedingungen für maximale, auf den

Abb.8 : Chromatogramm des Beta-Blockers Bupranolol
nach XAD-2 -Extraktion auf 3% SP2100 DB

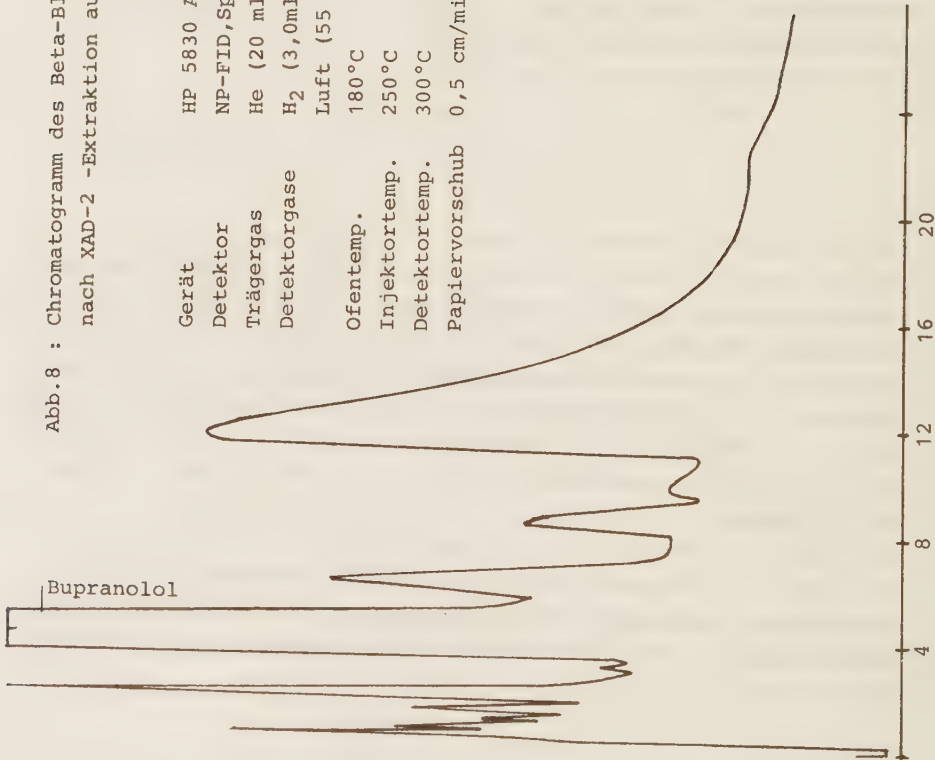
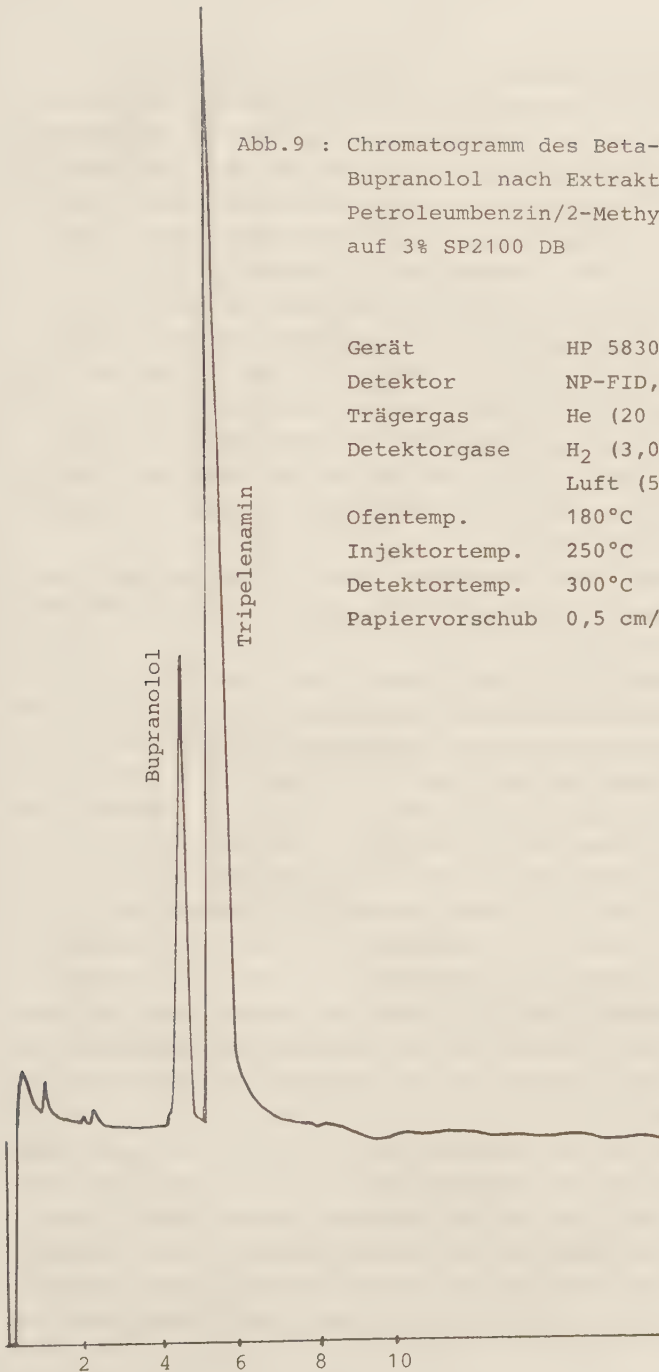


Abb.9 : Chromatogramm des Beta-Blockers
Bupranolol nach Extraktion mit
Petroleumbenzin/2-Methylbutanol (1)
auf 3% SP2100 DB

Gerät	HP 5830 A
Detektor	NP-FID, Spannung 18V
Trägergas	He (20 ml/min)
Detektorgase	H ₂ (3,0ml/min)
	Luft (55 ml/min)
Ofentemp.	180°C
Injektortemp.	250°C
Detektortemp.	300°C
Papiervorschub	0,5 cm/min



Durchschnitt optimierte Ausbeuten an Beta-Blockern zu finden. Zuerst wurden nach Arbeitsvorschrift IV Extraktionsmittelmischungen der Proportionen 80:20, 70:30 und 60:40 geprüft. Der Urinextrakt wurde eingengt und schließlich in 0,5 ml Äthanol aufgelöst. Bevor diese äthanolische Lösung zur Ausbeutenbestimmung untersucht werden konnte, mußte eine empirisch festgelegte Standardmenge von 0,5 µg Tripelenamin bzw. 5 µg Beta-Blocker zugefügt werden.

Weiterer Parameter zur Optimierung der Ausbeute war der pH-Wert der Urinprobe. Da pH 9,5 allgemein als günstigster Wert für die Extraktion von basischen Aminen angegeben wird, wählte man die pH-Werte 8,5, 9,5 und 10,5, die ausschließlich mit $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffer stabilisiert wurden. Einige Vorversuche mit $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer hatten nämlich ein unerwartetes Abfallen der Ausbeute bei einem pH von 9,5 relativ zu den mit reinem Ammoniakpuffersystem erzeugten pH 8,5 und pH 9,5 erbracht.

Dem Normalurin wurden nach Arbeitsvorschrift V jeweils 5 µg an Beta-Blockern beigemischt. Die internen Standards wurden nach dem Extrahieren zugesetzt.

Nachdem Standardsubstanz und Beta-Blocker nach Arbeitsvorschrift VI in gleichen Mengen wie in den Arbeitsvorschriften IV und V in Äthanol gelöst und gaschromatographisch analysiert worden waren, konnte die Ausbeute wie folgt errechnet werden: Es wurde der Quotient aus Peakhöhe des nichtextrahierten Beta-Blockers zur Peakhöhe des Standards gebildet. Dieser Wert entspricht einer Ausbeute von 100%. Die nach den Arbeitsvorschriften IV und V gewonnenen Quotienten aus Peakhöhe des extrahierten Beta-Blockers zu Peakhöhe des Standards wurden anschließend in prozentuale Relation zu diesem Wert gesetzt. Tabelle 9 enthält alle Ausbeuten in Prozent der im Urin ursprünglich enthaltenen Beta-Blocker-Menge. Alle Angaben sind aus durchschnittlich $\pm 5\%$ schwankenden Doppelbestimmungen gemittelt. Die jeweils höchsten Werte dieser Ausbeute-Analysen sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Bei Extraktionsbedingungen außerhalb der gewählten Variationsgrenzen wären für einzelne Beta-Blocker optimale Ausbeuten zu erzielen. Da jedoch ein möglichst weites Spektrum an Beta-Adrenolytika mit einer auf den Durchschnitt optimierten Methode erfaßt werden sollte, können die Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)-Mischung im Verhältnis 70:30 und der pH von 9,5 als günstigste Bedingungen er-

Tabelle 9 : Ausbeute in Prozent der eingegebenen Menge

Beta-Blocker	Standard	Extraktionsmittelmischung- gen bei $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ - Puffer pH 9,5	pH-Änderungen mit $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffer bei Extraktionsmittelmischung 70:30
INN	INN	80:20 70:30 60:40	8,5 9,5 10,5
Alprenolol	Tripelenamin	6,1 5,4 <u>11,5</u>	69,3 <u>86,7</u> 49,7
Bunitrolol	Bupranolol	63,6 79,3 <u>89,3</u>	44,3 64,3 <u>71,4</u>
Bupranolol	Bunitrolol	<u>42,9</u> 32,8 11,5	99,0 96,1 96,7
Propranolol	Tripelenamin	12,9 27,9 <u>21,3</u>	43,0 42,0 <u>54,5</u>
Timolol	Tripelenamin	24,8 29,2 <u>35,2</u>	35,9 59,4 <u>66,0</u>

Die höchsten Werte sind durch Unterstreichung hervorgehoben

achtet werden. Die zur Spalte '70:30' differierenden Werte bei 'pH 9,5' aus Tabelle 9 lassen zudem erkennen, daß – mit Ausnahme des Beta-Blockers Bunitrolol – durch ausschließliche Verwendung eines Ammoniakpuffersystems eine Ausbeutesteigerung etwa um den Faktor 2 zu erzielen ist. Bei Alprenolol zeigt sich dieser Effekt besonders deutlich. Dabei ist hervorzuheben, daß bei der Extraktion mit Hydrogencarbonatpuffer aufgrund der Salzsäurekonservierung des Normalurins und Alkalisieren mit konzentrierter Ammoniaklösung stets eine gewisse Menge an $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -System vorliegt.

4.5. Versuche zur Aufstellung der Eichgeraden

Die Erstellung von Eichgeraden ermöglicht die statistische Fundierung der Proportionalität zwischen Konzentration der gesuchten Substanz und Detektorsignalgröße. Dies erlaubt in gewissen Grenzen Rückschlüsse von der Höhe des Detektorsignals auf die Konzentration.

Die Konzentrationen von unmetabolisierten Beta-Blockern im Urin liegen etwa bei $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Deshalb erschienen Konzentrationen von 0,1, 0,3, 0,5, 1,0 und $2,0\mu\text{g}/\text{ml}$ Urin zur Erstellung der Eichgeraden geeignet.

4.5.1. Arbeitsbedingungen

Aufgrund ihrer guten Elutionseigenschaften bei Beta-Blockern wurde die Packung 3% SP2100 DB gewählt. Die Säulentemperatur lag isotherm bei 200°C . Da mit $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ Urin relativ geringe Konzentrationen vorlagen, wurde die Empfindlichkeit des NP-FID durch Steigerung der Dauerspannung auf 20V erhöht. Dabei mußte die Strömung des Detektorgases Wasserstoff auf $4,5\text{ml}/\text{min}$, die der Luft auf $60\text{ml}/\text{min}$ eingestellt werden.

Die inneren Standards wurden wie in Tabelle 9 gewählt. Weitere Angaben sind im Kapitel 4.2.2. angeführt.

4.5.2. Arbeitsmethode

Zur Pufferung des Urins diente das Hydrogencarbonatsystem, da die hiermit erzielten Ausbeuten aufgrund der hohen Empfindlichkeit des NP-FID selbst für geringste Konzentrationen von $0,1 \mu\text{g/ml}$ Urin genügte. Extraktionsmittelmischung war Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) im Verhältnis 70:30. Der Urin wurde auf pH 9,5 eingestellt. Nach Arbeitsvorschrift VIII wurden dem Normalurin steigende Mengen an Beta-Blockern zu den oben angegebenen Konzentrationen und die zugehörigen internen Standards beigelegt. Von dem in $50 \mu\text{l}$ Äthanol wiederaufgenommenen Extrakt wurden je $2-3 \mu\text{l}$ zur gaschromatographischen Analyse injiziert.

Aus den Doppelbestimmungen ergaben sich für jede vorgegebene Konzentration 'x' eines Beta-Blockers ein Quotientenpaar 'y=Peakhöhe des Beta-Blockers : Peakhöhe des Standards', also letztlich 2×5 Wertepaare (x;y) für jede Eichgerade 'y=A₁+B₁x' (A₁=Achsenabschnitt der Geraden; B₁=Steigung der Geraden). Die Ermittlung der Konstanten A₁ und B₁ geschieht unter der Voraussetzung, daß die Summe der Abstandskquadrate der y-Werte von der Eichgeraden ein Minimum wird. Tabelle 10 enthält neben den Konstanten A₁ und B₁ sowohl die Korrelationskoeffizienten aller Geraden als auch die Konstanten A₂ und B₂ der Umkehrfunktion 'x=A₂+B₂y'.

4.6. Berechnung der Retentionsindices nach KOVATS für die Phasen 3 % SP 2 1 0 0 DB , 3 % OV 2 2 5 und 1 % SP 1 0 0 0

In Anbetracht der ständig wachsenden Zahl der bei chemisch-toxikologischen Analysen zu erwartenden Wirkstoffen war es einem einzelnen Labor nicht mehr möglich, die erforderlichen gaschromatographischen Angaben für alle diese Verbindungen selbst zu erstellen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, gaschromatographische Daten zu normieren. Die am besten praktikierbare Methode stellt die von KOVATS (83) bereits im Jahre 1958 veröffentlichte Theorie der Retentionsindices (RI) dar. Nach BERNINGER und MÖLLER (22) können diese RI auch zur Identifizierung von Pharmaka herangezogen werden.

Tabelle 10 : Konstanten und Korrelationskoeffizienten der Eichgeraden der
 untersuchten Beta-Blocker

Beta-Blocker INN	Standard INN	A ₁	B ₁	Korrelations- koeffizient	A ₂	B ₂
Alprenolol	Tripelenamin	1,3288	0,9421	0,9919	-1,2627	1,0445
Bunitrolol	Bupranolol	-0,5308	0,2342	0,9758	2,5309	4,0657
Bupranolol	Bunitrolol	0,1730	4,1157	0,9490	-3,0105	21,8836
Propranolol	Tripelenamin	-0,9744	0,6577	0,9944	1,5751	1,5034
Timolol	Tripelenamin	0,5502	0,3523	0,9613	-0,8504	2,6229

4.6.1. Theorie und Definition

Die Theorie und Definition seien nach BERNINGER und MÖLLER (22) vereinfacht dargestellt : Als Bezugssubstanzen fungieren die n-Alkane, deren Retentionszeiten das gesamte Spektrum der gaschromatographisch flüchtigen Stoffe überdecken. Die Logarithmen dieser Retentionszeiten ergeben eine lineare Skala, in der jedem n-Alkan eine Maßzahl zugeordnet wird, die das Hundertfache der Summe seiner Kohlenstoffatome ist. Diese Maßzahlen sind als RI der n-Alkane definiert. Der RI einer interessierenden Verbindung errechnet sich dann durch lineare Interpolation zwischen den nächstliegenden Alkanen nach der Formel

$$RI_x = (I_2 - I_1) \frac{\lg(t'_x/t'_1)}{\lg(t'_2/t'_1)} + I_1$$

RI_x = RI der interessierenden Substanz x

I_1 = RI des nächstniederen n-Alkans

I_2 = RI des nächsthöheren n-Alkans

t'_1 = Nettoretentionszeit des nächstniederen n-Alkans

t'_2 = Nettoretentionszeit des nächsthöheren n-Alkans

t'_x = Nettoretentionszeit der Substanz x

Die Nettoretentionszeit t'_x ergibt sich durch Subtraktion der Totzeit t_m von der Bruttoretentionszeit aus dem Chromatogramm. Dieses – auch Durchbruchzeit genannte – Zeitintervall t_m entspricht einer Substanz wie z.B. Methan, die praktisch nicht von der Phase der Säulenpackung absorbiert wird und deshalb in dieser Zeit mit dem Trägergas den Weg vom Injektorblock zum Detektor zurücklegt. Zur Berechnung der Totzeit werden nach MACHATA (90) die Bruttoretentionszeiten von drei aufeinanderfolgenden n-Alkanen gleichen Abstands herangezogen. Die Formel stammt von PETERSON und HIRSCH (102) und lautet

$$t_m = \frac{t_x t_z - (t_y)^2}{t_x + t_z - 2t_y}$$

t_x, t_y, t_z = Bruttoretentionszeiten, z.B. der n-Alkane C_{14}, C_{16}, C_{18}

Die Retentionsindices stellen also in dem System der n-Alkane linearisierte gaschromatographische Laufzeiten dar und sind für isotherme Bedingungen definiert. Sie sind beinahe gänzlich unabhängig

von der Säulenlänge, der Dichte der Packung und der Trägergasgeschwindigkeit. Unvermeidbar ist jedoch die RI-Abweichung bei anderen isothermen Bedingungen und natürlich die RI-Spezifität für die betreffende Säulenpackung.

Als erste veröffentlichten KAZYAK und PERMISOHN (80) eine RI-Datensammlung für Pharmaka. Später folgten noch weitere analoge Arbeiten von CADDY et al. (34) und POST (105). MOFFAT (94) gab im Jahre 1975 auf der Säule SE30 die RI von 480 toxikologisch interessierenden Stoffen an. Nach BERNINGER und MÖLLER (22) ist die Brauchbarkeit dieser Datensysteme eingeschränkt, da – mit Ausnahme bei CADDY et al. und POST – die Arbeitstemperaturen nicht angegeben sind. Häufig ergeben sich auf einer Säule für mehrere Substanzen annähernd gleiche RI. Somit ist die sichere Identifizierung eines Wirkstoffs nicht mehr möglich, da nach Angaben von BERNINGER et al. (21) und MOFFAT (94) bereits innerhalb eines Labors mit durchschnittlichen Schwankungen von 4 RI-Einheiten und zwischen verschiedenen Laboratorien mit einer Streuung von 16 (4-34) Einheiten gerechnet werden muß. Daher werden in solchen Fällen die RI auf verschiedenen Säulenpackungen ermittelt, woraus ein für jede Substanz charakteristischer RI-"Code" resultiert. Schon KAZYAK und PERMISOHN (80) errechneten die RI ihrer Substanzen für die drei stationären Phasen OV1, OV17 und QF1.

4.6.2. Arbeitsbedingungen

Die RI-Werte der untersuchten Beta-Blocker und internen Standards wurden auf den stationären Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 ermittelt. Da der bisher verwendete NP-FID praktisch keine Empfindlichkeit für Alkane besitzt, mußte für diese Untersuchungen auf einen konventionellen FID ausgewichen werden, dessen Signal um den Faktor 10 für stickstoffhaltige Substanzen geringer ist. Die Detektorgase wurden auf 45 ml/min für Wasserstoff und 200 ml/min für Luft erhöht. Die Trägergasströmung blieb bei 20 ml/min. Die Säulentemperatur betrug bei 3% SP2100 DB und 1% SP1000 200°C, bei 3% OV225 220°C. Die Temperatur des Injektorblocks wurde auf 250°C, die des Detektors auf 300°C belassen. Für die Phase 3% SP2100 DB war das n-Alkan-Gemisch C₁₆-C₂₄ nötig,

für 3% OV225 die Reihe $C_{22}-C_{36}$ und für 1% SP1000 die n-Alkane $C_{24}-C_{36}$.

4.6.3. Arbeitsmethode

Die n-Alkane wurden unter Erwärmung auf 50 °C in n-Hexan gelöst. Aufgrund der geringen Empfindlichkeit des FID wurden die Konzentrationen der Alkane sowie der Beta-Blocker und Standards auf 1mg/ml festgesetzt. Für Beta-Blocker und interne Standards mußten äthanolische Lösungen hergestellt werden, da Wasser durch einen Hydrolyseeffekt das Säulenfüllmaterial schädigen könnte.

In Fünffachbestimmung wurden je 2µl sowohl des n-Alkan-Gemisches als auch der Beta-Blocker- und Standard-Lösungen der gaschromatographischen Analyse unterzogen.

Die Bruttoretentionszeiten dieser Fünffachbestimmungen wurden, sofern sie nicht identisch waren, gemittelt. Tabelle 11 enthält diese Zeiten sowie die RI-Werte aller Beta-Blocker, Standards und n-Alkane auf den drei genannten Phasen mit Angabe der Ofentemperaturen.

Die Ermittlung der RI kann auf verschiedene Weise vorgenommen werden: Die Logarithmentabelle ist ein verhältnismäßig zeitraubendes Hilfsmittel. Einfacher, jedoch etwas ungenauer, ist die graphische Bestimmung nach HUPE (69): Dabei werden auf die Ordinate eines halblogarithmischen Millimeterpapiers die mit 100 multiplizierten C-Zahlen der n-Alkane und auf der logarithmisch unterteilten Abszisse ihre Nettoretentionszeiten aufgetragen. Durch Inter- oder Extrapolation kann nun aus der Nettoretentionszeit einer unbekannten Probe über die Nettoretentionszeit-RI-Gerade der n-Alkane auf den RI dieser Probe geschlossen werden.

Steht jedoch ein programmierbarer Taschenrechner wie der HP 65 zur Verfügung, sind die RI nach der Methode von MACHATA (90) in kürzester Zeit errechenbar.

Tabelle 11 : Retentionszeiten und RI der untersuchten Beta-Blocker
auf den stationären Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000

Säulenfüllmaterial		3% SP2100 DB		3% OV225		1% SP1000	
Säulentemperatur; Trägergas (He)-Strömung		200°C; 20ml/min		220°C; 20ml/min		200°C; 20ml/min	
Totzeit t _m		0,17		0,11		0,15	
INN	Handelsname	Brutto- Ret.zeit	RI	Brutto- Ret.zeit	RI	Brutto- Ret.zeit	RI
Alprenolol	Aptin	1,46	1834	1,48	2461	1,76	2523
Bunitrolol	Stresson	2,42	1989	4,93	2901	6,03	2924
Bupranolol	Betadrenol	2,05	1939	2,25	2617	2,60	2653
Propranolol	Dociton	4,64	2180	6,75	3013	10,40	3096
Timolol	Temserin	7,21	2306	10,87	3182	14,75	3206
Triipelenamin	Pyribenzamin	2,28	1971	2,13	2597	2,39	2625
C ₂ -Schritte	C ₁₆	0,73	1600	-	-	-	-
	C ₁₈	1,31	1800	-	-	-	-
	C ₂₀	2,51	2000	-	-	-	-
	C ₂₂	4,97	2200	0,75	2200	-	-
	C ₂₄	10,00	2400	1,26	2400	1,23	2400
C ₄ -Schritte	C ₂₈	-	-	3,72	2800	4,08	2800
	C ₃₂	-	-	11,42	3200	14,46	3200
	C ₃₆	-	-	35,50	3600	49,60	3600

4.7. Anwendungsbeispiel anhand eines authentischen Patientenurins

Die in dieser Arbeit entwickelte Nachweismethode konnte bereits zur quantitativen Bestimmung des Beta-Blockers Propranolol eingesetzt werden. Dabei handelte es sich um einen Patienten, bei dem ein hyperkinetisches Herzsyndrom vermutet wurde, nachdem alle anderen Ursachen für den früher festgestellten Bluthochdruck ausgeschlossen werden konnten. Der Patient wurde auf DOCITON^R40 mit 3,5 Tabletten pro Tag eingestellt, wonach sich der Blutdruck auf 120/80 normalisierte, später jedoch wieder zwischen 150/80 und 170/80 lag. Zu klären war nun, ob der Patient die Einnahme des Medikaments abgebrochen hat oder ob eine DOCITON^R-Resistenz besteht.

4.7.1. Arbeitsbedingungen

Die allgemeinen gaschromatographischen Bedingungen sind aus Kapitel 4.2.2. zu entnehmen. Die Säulentemperatur von 3% SP2100 DB wurde isotherm auf 200°C gehalten. Wegen der geringen physiologischen Konzentrationen wurde der NP-FID bei einer Dauerspannung von 20V eingesetzt. Die Detektorgasströmungen beliefen sich auf 4,5ml/min bei Wasserstoff und 60ml/min bei Luft.

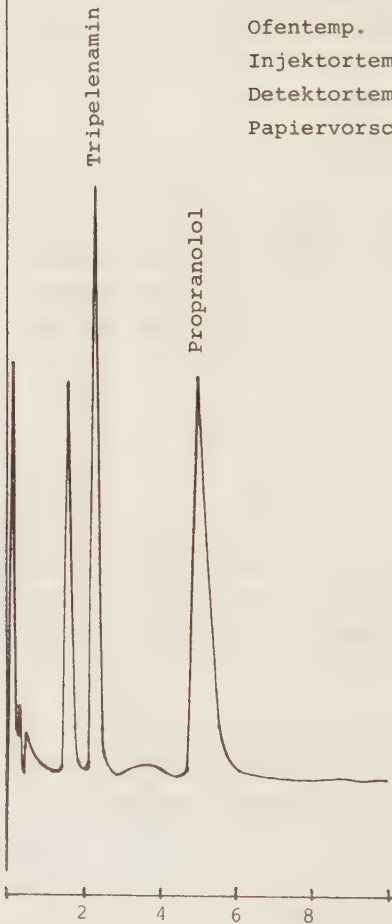
4.7.2. Arbeitsmethode

Analog Arbeitsvorschrift VII wurde die Arbeitsvorschrift VIII entwickelt, wonach der zur Verfügung stehende Patientenurin in Doppelbestimmung mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) (70:30) bei dem pH 9,5 extrahiert wurde. Der interne Standard Tripelenamin war vor der Extraktion zugefügt worden.

In den daraus erhaltenen Chromatogrammen (siehe Abb.10) war neben dem Peak des inneren Standards mit der Bruttoretentionszeit von 2,28min ein weiterer mit einer in beiden Chromatogrammen der Doppelbestimmung identischen Bruttoretentionszeit von 4,67min zu finden. Unter Benützung der Formeln in Kapitel 4.6. resultiert daraus

Abb.10 : Chromatogramm des Beta-Blockers Propranolol nach Extraktion eines authentischen Patientenurins auf der stationären Phase 3% SP2100 DB

Gerät	HP 5830 A
Detektor	NP-FID, Spannung 20V
Trärgas	He (20 ml/min)
Detektorgase	H ₂ (4,5ml/min)
	Luft (60 ml/min)
Ofentemp.	200°C
Injektortemp.	250°C
Detektortemp.	300°C
Papiervorschub	0,5 cm/min



für die unbekannte Substanz ein RI von 2182. Dieser Wert liegt um 2 RI-Einheiten höher als der in Kapitel 4.6. ermittelte Wert für Propranolol. Damit kann, im Hinblick auf die von BERNINGER et al. (21) angegebene Schwankung von 4 RI-Einheiten, die Identität dieses Peaks mit Propranolol angenommen werden.

Der Quotient ' $y = \text{Peakhöhe des Beta-Blockers} : \text{Peakhöhe des Standards}$ ' ergibt als Mittelwert der Doppelbestimmung 0,739. Mit der Umkehrfunktion ' $x = A_2 + B_2 y$ ' aus Kapitel 4.5. und den Werten A_2 und B_2 aus Tabelle 10 kann nun für Propranolol die ursprüngliche Konzentration von 0,269 $\mu\text{g/ml}$ Urin errechnet werden.

Die physiologischen Konzentrationen von Beta-Blockern bei einer Dosierung von 10mg/6h liegen nach Angaben der Literatur bei 6-12 $\mu\text{g/ml}$ Urin. Dieser Wert bezieht sich auf metabolisierte und unveränderte Beta-Adrenolytika. Nachdem bei diesem Patienten eine Dosierung von 3,5 x 40 mg/d entsprechend 35 mg/6h vorlag, und für unmetabolisiertes Propranolol eine Ausscheidungsmenge von weniger als 1% der Dosis angegeben wird, kann die gefundene Konzentration von 0,269 $\mu\text{g/ml}$ Urin als physiologisch angesehen werden.

Damit konnte Propranolol nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

4.7.3. Nachweisgrenzen

Propranolol mit einer Extraktionsausbeute von 27,9% und einer Reinsubstanzausscheidung von weniger als 1% der Dosis erschien im Chromatogramm dieser speziellen Untersuchung mit der 0,739-fachen Peakhöhe des inneren Standards und war damit ohne Schwierigkeiten zu identifizieren. Die gefundene Konzentration von 0,269 $\mu\text{g/ml}$ Urin liegt etwa um den Faktor 3 höher als die niedrigste Konzentration der Eichgeraden aus Kapitel 4.5., mit der die Nachweisgrenze dieses Verfahrens annähernd erreicht wurde. Bei ausschließlicher Verwendung des Ammoniakpuffers kann die Nachweisgrenze von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Urin gesenkt werden.

Die Nachweisgrenzen der übrigen Beta-Blocker liegen entsprechend ihrer N-Äquivalente, Extraktionsausbeuten und Reinsubstanzausscheidung etwa in derselben Größenordnung.

4.8. Arbeitsvorschriften

I Derivatisierung und Nachderivatisierung von Beta-Blockern mit Propionsäureanhydrid (PSA) und Pyridin

100µl einer wässrigen Beta-Blocker-Lösung der Konzentration 1mg/ml werden mit 0,9ml wässriger gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 1,0ml PSA/Äthylacetat (2:98) vermengt. Dies wird 2min lang mit einem automatischen Schüttler gemischt und anschließend bei 3000U/min zentrifugiert. Die organische Phase wird abgenommen und nach dem Einengen in 50µl konzentrierter PSA und 50µl Pyridin gelöst. Dies wird 1h bei 80°C unter Luftabschluß im Wasserbad erhitzt und zuletzt eingeeengt. Der Rückstand wird zur GC-Analyse in 1ml Äthylacetat aufgenommen.

Für die Arbeitsvorschriften II-VII stand pharmakafreier Normalurin zur Verfügung, der aus Gründen der Konservierung mit 1nHCl auf pH3 eingestellt wurde.

II Extraktion mit AMBERLITE XAD-2- Austauscherharzsäulen

Zu 20ml Urin werden je 0,2ml wässriger Beta-Blocker- und Triphenylamin-Lösung der Konzentration von je 1mg/ml gegeben, mit einigen Tropfen konz. Ammoniaklösung auf etwa pH9,5 gebracht und dazu 4ml $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer zur exakten Einstellung des pH9,5 zugefügt. Dieses Gemisch wird auf die XAD-2-Säulen gegeben und anschließend mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe gänzlich abgesaugt. Nun werden die vorher in der Säule festgehaltenen Substanzen mit 3x5ml des Elutionsmittels Äthylacetat/1,2-Dichloräthan (6:4) in Auffanggefäße gespült. Das Eluat wird bei 80°C mit einer Wasserstrahlpumpe zur Trockne eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand in 2ml n-Propanol aufgenommen und der gaschromatographischen Untersuchung zugeführt.

III Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)

Zu 5,0 ml Urin werden je 50µl wässriger Beta-Blocker- und Tripele-
lenamin-Lösung der Konzentration von je 1mg/ml, einige Tropfen
konz. Ammoniaklösung für einen pH von etwa 9,5 und 1ml NaHCO_3 /
 Na_2CO_3 -Puffer zur exakten Einstellung des pH 9,5 zugegeben. Dazu
werden 2ml des Extraktionsmittels Petroleumbenzin (40°C Siedepunkt) /
2-Methylbutanol(1) (95:5) gefügt. Diese Mischung wird 30sec auto-
matisch geschüttelt und 5min bei 3000U/min zentrifugiert. Der Über-
stand wird bei 80°C mit einer Wasserstrahlpumpe eingeeengt und zur
gaschromatographischen Untersuchung in 0,5ml Äthanol gelöst.

IV Ausbeuteoptimierung mit Änderung der Extraktions- mittelmischung

Zu 5ml Urin werden 50µl einer wässrigen Beta-Blocker-Lösung der
Konzentration 100µg/ml gefügt. Um einen pH von etwa 9,5 zu errei-
chen, gibt man einige Tropfen konz. Ammoniaklösung, und zur glas-
elektrodengeprüften Einstellung des pH 9,5 1ml NaHCO_3 / Na_2CO_3 -Puf-
fer hinzu. Darauf wird das Extraktionsmittel Petroleumbenzin/2-Me-
thylbutanol(1) in den Mischungen 80:20, 70:30 bzw. 60:40 zu jeweils
2ml gebracht. Weiterhin wird analog Arbeitsvorschrift III verfahren.
Den 0,5ml Äthanol werden jedoch noch vor der gaschromatographi-
schen Analyse 50µl einer wässrigen Tripelenamin- bzw. Beta-Blocker-
standard-Lösung der Konzentration 10 bzw. 100µg/ml beigemischt.

V Ausbeuteoptimierung mit Änderung der pH-Werte des Urins

Zu 5ml Urin werden 50µl einer wässrigen Beta-Blocker-Lösung der
Konzentration 100µg/ml gefügt. Um einen pH von etwa 9,5 zu errei-
chen, werden einige Tropfen konz. Ammoniaklösung beigemischt. Unter
Glaselektrodenkontrolle werden mit $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffer und einigen
Tropfen konz. Ammoniak- bzw. 1n Salzsäure-Lösung die pH-Werte 8,5,
9,5 und 10,5 exakt eingestellt. Darauf werden 2ml des Extraktions-
mittels Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) (70:30) geschichtet.
Weiterhin wird wie in Arbeitsvorschrift IV verfahren.

VI Mischungen der nichtextrahierten Substanzen zur Bestimmung der Ausbeute

Es werden in 450µl Äthanol 50µl einer äthanolischen Beta-Blocker-Lösung der Konzentration 100µg/ml und 50µl einer äthanolischen Tripelenaminlösung der Konzentration 10µg/ml bzw. einer Beta-Blockerstandard-Lösung der Konzentration 100µg/ml gelöst und der gaschromatographischen Trennung unterzogen.

VII Extraktionen mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) zur Bestimmung der Eichgeraden

Für die Konzentrationen 0,1 ,0,3 ,0,5 ,1,0 und 2,0µg/ml wurden von Normalurin 4,95,4,85,4,75,4,5 und 4,0 ml, von wässr.Beta-Blocker-Lösungen

der Konzentration 10µg/ml 50, 150, 250,500 und 1000µl und von Tripelenamin- bzw. Beta-Blockerstandard-Lösungen der Konzentration 100µg/ml je 50µl gemischt.

Dazu werden für ungefähren pH9,5 einige Tropfen konz. Ammoniaklösung und für glaselektrodengeprüften pH9,5 1ml NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer gegeben.Darüber werden 2ml des Extraktionsmittels Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) geschichtet.Anschließend wird 30sec automatisch geschüttelt und 5min bei 3000U/min zentrifugiert.Der Überstand wird bei 80°C mit einer Wasserstrahlpumpe eingeengt und in 50µl Äthanol aufgelöst.Davon werden etwa 2-3µl gaschromatographisch untersucht.

VIII Extraktion von Beta-Blockern aus authentischen Urinen

Zu 5ml Patientenurin (physiologischer pH) werden 50µl einer Tripelenamin- bzw. Beta-Blockerstandard-Lösung der Konzentration 100µg/ml,einige Tropfen konz. Ammoniaklösung bis ca.pH9,5 und 1ml NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer für glaselektrodengeprüften pH9,5 gegeben. Darüber schichtet man 2ml des Extraktionsmittels Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) (70:30) und verfährt weiterhin analog Arbeitsvorschrift VII.

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, eine labortechnisch einfache und für Beta-Blocker selektive Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe eine Reihe von Beta-Adrenolytika gleichermaßen im Urin nachgewiesen werden kann.

Dieses Verfahren beruht auf der Extraktion von unmetabolisierten Beta-Blockern aus Urin und dem anschließenden gaschromatographischen Nachweis dieser Pharmaka. Die eigene Extraktionsmittelmischung 70 Teile Petroleumbenzin (40°C Siedepunkt) zu 30 Teilen 2-Methylbutanol (1) weist eine sehr hohe Selektivität für Beta-Blocker und eine für gaschromatographische Empfindlichkeit ausreichende Wiederfindungsrate auf, sodaß der quantitative Nachweis von Beta-Blockern selbst nach therapeutischer Dosierung gelingt. Da für die nachzuweisenden Beta-Blocker ein 'screening'-Verfahren entwickelt werden sollte, war eine Extraktionsoptimierung auf den Durchschnitt mit den erforderlichen Kompromissen bei den einzelnen Beta-Blockern nötig.

Durch Einengen von 2ml Extraktionsüberstand und Wiederaufnehmen in 50µl Äthanol wird ein Konzentrationsfaktor von etwa 40 gewonnen, wobei sich im Chromatogramm noch keine wesentliche Störung durch mitkonzentrierte Begleitstoffe bemerkbar macht. Dieser Faktor liefert in Verbindung mit der hohen Selektivität der Extraktionsmethode gaschromatographisch gut detegierbare Mengen an Beta-Blockern. Die Erhöhung der Ausbeute um den Faktor 2 durch ausschließliche Verwendung eines Ammoniakpuffers, wie in Kapitel 4.4.4. beschrieben, eröffnet im allgemeinen keine ausschlaggebende Erweiterung der Nachweisgrenzen. Lediglich bei Alprenolol wäre wegen der außergewöhnlich geringen Ausbeute in Verbindung mit dem Hydrogencarbonatpuffer bei Urinextraktionen dieser Substanz das Ammoniakpuffersystem vorzuziehen.

Da grundsätzlich nur unmetabolisierte Beta-Blocker nachgewiesen werden, entfällt bei dieser Methode die umfangreiche Hydrolyse der Glucuronsäureester der Beta-Adrenolytika. In der Literatur fanden sich jedoch nicht für alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Beta-Blocker Angaben über die prozentuale renale Ausscheidung an unveränderter Reinsubstanz. Falls diese Informationslücken durch

künftige Untersuchungen geschlossen werden sollten und die Rein-
substanzausscheidung bei diesen Beta-Blockern wider Erwarten mit
der hier vorgestellten Analytik nicht unmittelbar erfaßbar sein
sollte, besteht die Möglichkeit der Kopplung mit einer Hydrolyse
der Glucuronsäureester im Urin analog DAVIS (43) oder WEIL-MALHER-
BE (138).

Sollten diese pharmakokinetischen Untersuchungen auch exaktere und
umfangreichere Aussagen über die prozentuale Verteilung der meta-
bolisierten und unveränderten Beta-Blocker im Urin erlauben, könn-
ten nach quantitativem Nachweis unter Berücksichtigung der Ausbeu-
te genauere Rückschlüsse auf die eingenommene Dosis gezogen wer-
den.

Wenn die Retentionszeiten von eventuell zusätzlich applizierten
Medikamenten auf einer verwendeten Säule bekannt und von den Sig-
nalen der Beta-Blocker differenzierbar sind, und ein interner Stan-
dard verwendet wird, dürfte im allgemeinen die Bestimmung der RI
auf nur einer Säule zur Identifikation des Beta-Blockers genügen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Nachweismethoden der Literatur galten bisher meist nur einer einzigen Substanz und waren in labortechnischer Hinsicht mit relativ hohem Aufwand verbunden.

Deshalb sollte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem in kurzer Zeit unter geringem Aufwand eine größere Zahl an Beta-Blockern nach therapeutischer Dosierung aus Urin extrahiert und sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden kann. In diesem Zusammenhang sei die Dissertation von RIEDL (111) erwähnt, in der weitere fünf Beta-Blocker in analoger Weise bearbeitet wurden.

Die anfänglich getestete Dünnschichtchromatographie zeigte zu geringe Spezifität, und ihre Empfindlichkeit war zum Nachweis von Beta-Blockern nach therapeutischer Dosierung bei weitem nicht ausreichend.

Erst die Gaschromatographie eröffnete die Möglichkeit, in Kombination mit dem selektiv hoch N-empfindlichen NP-FID, die geringen physiologischen Mengen, wie sie nach therapeutischer Dosierung im Urin vorliegen, erfassen zu können.

Von sechs getesteten Säulenpackungen waren 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 in Zusammenhang mit der vorgestellten selektiven Extraktionsmethode zur Trennung unmetabolisierter Beta-Blocker brauchbar.

Die Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid und Pyridin erwies sich für die geringen Verbesserungen der Chromatogrammqualität als zu aufwendig und wurde deshalb nicht in die endgültige Extraktionsvorschrift aufgenommen.

Das AMBERLITE XAD-2 - Austauscherharzsystem zeigte zwar gute Ausbeuten, jedoch wurden zu viele störende Begleitsubstanzen mitextrahiert. Deshalb wurde ein Extraktionsgang mit einer eigenen Mischung von 70 Teilen Petroleumbenzin (40°C Siedepunkt) zu 30 Teilen 2-Methylbutanol (1) unter Verwendung des Hydrogencarbonat-Puffersystems von pH 9,5 entwickelt. Mit diesen auf den Durchschnitt optimierten Bedingungen konnten die Beta-Blocker mit hoher Selektivität und einer für gaschromatographische Empfindlichkeit befriedigenden Ausbeute aus Urin extrahiert werden.

Zur Identifizierung der Beta-Blocker wurde das von KOVATS (83) ein-

geführte RI-System herangezogen. Für die Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 wurden die RI der getesteten Beta-Blocker aufgelistet.

Anhand eines authentischen Patientenurins konnte die Praktikabilität der entwickelten Methode durch qualitativen und quantitativen Nachweis des Beta-Blockers Propranolol aufgezeigt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Åblad, B., Borg, K.O., Johnsson, G., Regårdh, C.-G. und Sölvell, L., Life Sci. 14, 693-704 (1974)
2. Åblad, B., Ervik, M., Hallgren, J., Johnsson, G. und Sölvell, L., Eur.J.Clin.Pharmacol. 5, 44-52 (1972)
3. Ånggård, E. und Sedvall, G., Analyt.Chem. 41, 1250-1256 (1969)
4. Ahlquist, R.P., Amer.J.Physiol. 153, 586 (1948)
5. Ahlquist, R.P., J.Pharm.Sci. 55, 369 (1966)
6. Ahlquist, R.P. und Levy, B., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 172, 146 (1959)
7. Alber, L.L., J.A.O.A.C. 52, 1295 (1969)
8. Alcock, S.J. und Bond, P.A., Proc.Eur.Soc.Study Drug Toxicol. 4, 30 (1965)
9. Alltech Associates, inc., Cat. 26, 19 (1977/78)
10. Ambler, P.K., Singh, B.N. und Lever, M., Clin.Chim.Act. 54, 373-375 (1974)
11. Apha Academy of Pharmaceutical Sciences, Guidelines for Biopharmaceutical Studies in Man, Washington 1972
12. Appelgren, C., Borg, K.O., Elofsson, R. und Johansson, K.A., Act.Pharm.Suecica 11, 325-332 (1974)
13. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Arzneiverordnung in der Praxis 7 (1977)
14. Aue, W.A., Gehrke, C.W., Tindle, Q.C., Stalling, W.L. und Ruyle, C.D., J.Gas Chromatogr. 5, 381 (1967)
15. Auterhoff, H., Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Stuttgart 1974
16. Auterhoff, H. und Kovar, K.A., Identifizierung von Arzneistoffen, 2.Aufl., Wissenschaftl. Verlags GmbH, Stuttgart 1973
17. Auterhoff, H. und Stanke, R., Dtsch.Apotheker Ztg. 116, 1596-1597 (1976)
18. v.Bahr, C., Alvan, G., Lind, M., Mellstrom, B. und Sjöqvist, F., Act.Pharmaceut.Suecica 11, 649-650 (1974)
19. v.Bahr, C., Collste, P., Frisk-Holmberg, M., Haglund, K., Jorfelt, L., Orme, M., Östman, J. und Sjöqvist, F., Clin.Pharmacol.Therapeut. (1976)

20. Bergmann, J.F., Verhand. der Dtsch. Gesellsch. für innere Med. (Sonderdruck) 76, 925-927 (1970)
21. Berninger, H., Grünagel, R., Mall, S., Möller, M.R., Beitr. gerichtl. Med. 33, 185 (1975)
22. Berninger, H. und Möller, M.R., Arch. Toxicol. 37, 295-305 (1977)
23. Bianchetti, G., Graziani, G., Brancaccio, D., Morganti, A., Leonetti, G., Manfrin, M., Segal, R., Gomeni, R., Ponticelli, C. und Morselli, P.L., Clin. Pharmacokin. 1, 373 (1976)
24. Black, J.W., Duncan, W.A.M. und Shanks, R.G., Brit. J. Pharmacol. 25, 577-591 (1965)
25. Black, J.W. und Prichard, B.W.C., Brit. Med. Bull. 29, 163-167 (1972)
26. Boehringer Sohn, C.H., Stresson^R, 5, Ingelheim 1977
27. Bodem, G., Brammell, H.L., Weil, J.V. und Chidsey, C.A., J. Clin. Inv. 52, 747-754 (1973)
28. Bodin, N.-O., Life Sci. 14, 685-692 (1974)
29. Bodin, N.-O., Borg, H.O., Johansson, R., Obianwu, H. und Svensson, R., Act. Pharmacol. Toxicol. 35, 261-269 (1974)
30. Bond, P.A., Nature 18, 721 (1967)
31. Braun, P., Friedel, D., Klaus, W., Kockelke, W., Reker, K., Unfall- und Sicherheitsforschung Straßenverkehr 16, 395-403 (1978)
32. Brooks, C.J.W. und Horning, E.C., Analyt. Chem. 36, 1540-1545 (1964)
33. Butts, W.C., Analyt. Biochem. 46, 187-199 (1972)
34. Caddy, B., Fish, F. und Scott, D., Chromatographia 6, 293-300 (1973)
35. Chidsey, C.A., Morselli, P., Bianchetti, G., Morganti, A., Leonetti, G. und Zanchetti, A., Circulation 52, 313-318 (1975)
36. Chundela, B., persönliche Mitteilung, Prag 1968
37. Clarke, E.G.C., Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, London 1969
38. Clarke, D.D., Wilk, S. und Gitlow, S.E., J. Gas Chromatogr. 4, 310 (1966)
39. Cleaveland, C.R. und Shand, D.G., Clin. Pharmacol. Therapeut. 13, 181-185 (1972)
40. Coltart, D.J. und Shand, D.G., Brit. Med. J. 3, 719-778 (1970)
41. Cooper, R.G. und Hayes, A., persönliche Mitteilung 1971

42. Cuypers, J., Dissertation Heidelberg 1971
43. Davis, V.E., Huff, J.A. und Brown, H., J. Lab. Clin. Med. 66, 390-402 (1965)
44. Dill, W.A. und Glazko, A.J., J. Biol. Chem. 179, 395 (1949)
45. Di Salle, E., Baker, K.M., Bareggi, S.R., Watkins, W.D., Chidsey, C.A., Frigerio, A. und Morselli, P.L., J. Chromatogr. 84, 347-353 (1973)
46. Drew, A.O. und Leech, S., Toxicol. Abstr. 1, 3-X1 (1978)
47. Ehrhart, G. und Ruschig, H., Arzneimittel, Bd. 2, 2. Aufl., 178-180, Verlag Chemie, Weinheim 1972
48. Ehrsson, H., Communications, J. Pharm. Pharmacol. 27, 971 (1975)
49. El Gendi, S., Kisser, W. und Machata, G., Mikrochem. Act. 120 (120)
50. Ervik, M., Act. Pharmaceut. Suecica 6, 393-400 (1969)
51. Ervik, M., Act. Pharmacol. Toxicol. 36, 136-144 (1975)
52. Evans, G.H., Nies, A.S. und Shand, D.G., J. Pharmacol. Exptl. Therapeut. 186, 114-122 (1973)
53. Evans, G.H. und Shand, D.G., Clin. Pharmacol. Therapeut. 14, 487-493 (1973)
54. Evans, G.H. und Shand, D.G., Clin. Pharmacol. Therapeut. 14, 494-500 (1973)
55. Fike, W.W., Analyt. Chem. 38, 1697 (1966)
56. Fitzgerald, J.D. und O'Donnell, S.R., Brit. J. Pharmacol. 43, 222-235 (1971)
57. Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2. überarb. Aufl., 122-126, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim-Wien-Zürich 1977
58. Gault, R., Monforte, J.R. und Khasnabis, S., Clin. Toxicol. 11, 295-299 (1977)
59. George, C.F., Fenyvesi, T., Conolly, M.E. und Dollery, C.T., Europ. J. Clin. Pharmacol. 4, 74-76 (1972)
60. Gibaldi, M., Boyes, R.N. und Feldman, S., J. Pharm. Sci. 60, 1338-1340 (1971)
61. Gilette, J.R., Pharmacol. Pharmacokin., Fogarty International Center Proceedings No. 20, 209-231, Plenum Press 1974
62. Giudicelli, J.-F., Tillement, J.-P. und Boiesier, J.-R., J. Pharmacol. (Paris) 4, 129-136 (1973)
63. Goenechea, S., J. Chromatogr. 36, 375 (1968)
64. Goldman, V., Comerford, R., Hughes, A. und Nyberg, S., Nature 224, 1175-1178 (1969)

65. Goodman, L.S. und Gilman, A., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5. Aufl., 547-560, Macmillan New York 1975
66. Hayes, A. und Cooper, R.G., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 176, 302-311 (1971)
67. Hicks, D.C., Brit.J.Pharmacol. 47, 680ff (1973)
68. Howe, R. und Shanks, R.G., Nature 210, 1336 (1966)
69. Hupe, K.P., J.Gas Chromatogr. 3, 12 (1965)
70. ICI, Crowther, A.F. und Smith, L.H., Belg.Pat. 640312 (1963)
71. ICI, Stephenson, J.S., Brit.Pat. 909357 (1962)
72. Imhof, P., Die Bedeutung der Beta-I- und Beta-II-Selektivität und der intrinsischen sympathikomimetischen Aktivität von Beta-Blockern für die Hypertoniebehandlung, Vortrag, Wien 31.01.1975; zitiert in : Wiener klinische Wochenschrift (Sonderdruck), 88 (2), 68-71 (1976)
73. Ishizaki, T., Privitera, P.J., Walle, T. und Gaffney, T.E., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 189, 626-632 (1974)
74. Jack, D.B. und Riess, W., J.Chromatogr. 88, 173-176 (1974)
75. Johansson, K.A., Appelgren, C., Borg, K.O. und Eloffsson, R., Act.Pharmaceut.Suecica 11, 333-346 (1974)
76. Johansson, R., Regårdh, C.-G. und Sjögren, J., Act.Pharmaceut.Suecica 8, 59-70 (1971)
77. Johnsson, G.G. und Regårdh, C.-G., Clin.Pharmacokin. 1, 233-263 (1976)
78. Kauert, G., Dissertation Bonn 1977
79. Kaye, C.M., Robinson, D.G. und Turner, P., Brit.J.Pharmacol. 49, 155-156 (1973)
80. Kazyak, L. und Permisohn, R., J.Forens.Sci. 15, 346-353 (1970)
81. Kendall, M.J., Mitchard, M., West, M., John, V.A. und Ebbutt, A.F., Eur.J Drug Metabol.Pharmacokin. 3, 155-160 (1976)
82. Koch-Weser, J. und Sellers, E.M., New England J.Med. 294, 526-531 (1976)
83. Kovats, E., Helv.Chim.Act. 41, 1915 (1958)
84. Küchlin, R., Dissertation Bonn 1971
85. Lameur, W., Thesis, University of Amsterdam, De Kroon, Hilversum 1973
86. Levy, B., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 127, 146 (1959)
87. Levy, B. und Wilkenfeld, B.E., Fedn.Proc.Fedn.Am.Socs.Exptl.Biol. 29, 1362-1364 (1970)

88. Lilly, E., US.Pat. 2938921 (1960)
89. Macek, K. und Vecerkova, J., Pharmazie 20, 605 (1965)
90. Machata, G., Z.Rechtsmed. 79, 193-198 (1977)
91. McReynolds, W.O., Gas Chromatographic Data, Preston Techn. Abstracts Co., Evanston 1967
92. v.Meyer, L., Dissertation Erlangen-Nürnberg 1975
93. v.Meyer, L. und Hauck, G., Beitr.Gerichtl.Med. XXIX, 408 (1972)
94. Moffat, A.C., J.Chromatogr. 113, 69-95 (1975)
95. Moran, N.C. und Perkins, M.E., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 124, 223 (1959)
96. Mulé, S.J., J.Chromatogr. 55, 255 (1971)
97. Mulé, S.J., Bastos, D., Jukofsky, D. und Saffer, E., J.Chromatogr. 63, 289 (1971)
98. Ohio Valley Speciality Chemical, inc., Cat. 26, (1977/78)
99. Paget, G.E., Brit.Med.J. 11, 1266 (1963)
100. Parsons, R.L., Kaye, C.M., Raymond, K., Trounce, J.R. und Turner, P., Gut 17, 139-143 (1976)
101. Paterson, J.W., Conolly, M.E., Dollery, C.T., Hayes, A. und Cooper, R.G., Pharmacologica Clinica 2, 127-133 (1970)
102. Peterson, M.L. und Hirsch, J., J.Lipid Res. 1, 132 (1959)
103. Pfeiffer, S. und Zimmer, C.H., Pharmazie 30, 625-633 (1975)
104. Pharmazeutische Stoffliste, Index Nominum (1978)
105. Post, D., Beitr.Gerichtl.Med. 34, 219 (1976)
106. Potter, L.T., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 155, 91-100 (1967)
107. Powell, C.E. und Slater, J.H., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 122, 480 (1958)
108. Quaglio, M.P. und Cavicchi, G.S., Edizione Pratica 11, (1975)
109. Rawlins, M.D., Colliste, P., Frisk-Holmberg, M., Lind, M., Östman, J. und Sjöqvist, F., Eur.J.Clin.Pharmacol. 7, 353 (1974)
110. Regårdh, C.-G., Act.Pharmacol.Toxicol. 37, 3-39 (1975)
111. Riedl, A., Dissertation München 1980
112. Rohrschneider, L., J.Chromatogr. 22, 6-22 (1966)
113. Sawchuk, R.J., Robayo, J. und Miller, K.W., Brit.J.Clin.Pharmacol. 1, 440-442 (1974)
114. Shand, D.G., Drugs 7, 39-47 (1974)
115. Shand, D.G., Nuckolls, E.M. und Oates, J.A., Clin.Pharmacol. Therapeut. 11, 112-120 (1970)
116. Shand, D.G. und Rangno, R.E., Pharmacology 7, 159-168 (1972)

117. Sharp & Dohme GmbH, persönliche Mitteilung, November 1977
118. Smolen, V.F. und Schoenwald, R.D., J. Pharmaceut. Sci. 60, 96-103 (1971)
119. Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
120. Stanke, R., Dissertation Tübingen 1976
121. Supelco, inc., Chromatography/Lipids, Bull. 723 B, Pennsylvania
122. Supelco, inc., Chromatography/Lipids, Bull. 734, Pennsylvania 1973
123. Supelco, inc., Chromatography/Lipids, Bull. 755, Pennsylvania
124. Supelco, inc., Chromatography Supplies, Cat. 11, Pennsylvania 1977
125. Taylor, S.H., Therapiewoche 25, 4309-4312 (1975)
126. Taylor, S.H., Australian Family Physician 4, 30-35 (1975)
127. Thompson, F.D., Joeques, A.M. und Foulkes, D.M., Brit. Med. J. 2, 434-436 (1972)
128. Tocco, D.J., Duncan, A.E.W., Deluna, F.A., Hucker, H.B., Gruber, V.F. und Vandenheuvel, W.J.A., Drug Metabol. Dispos. 3, 361-370 (1975)
129. Vidic, E. und Schütte, J., Arch. Pharm. 295, 342 (1962)
130. Walle, T., Act. Pharmaceut. Suecica 5, 367-384 (1968)
131. Walle, T., J. Pharm. Sci. 12, 1885-1891 (1974)
132. Walle, T. und Ehrsson, H., Act. Pharmaceut. Suecica 7, 388-406 (1970)
133. Walle, T. und Ehrsson, H., Act. Pharmaceut. Suecica 8, 27 (1971)
134. Walle, T. und Gaffney, T.E., J. Pharmacol. Exptl. Therapeut. 182, 83-86 (1972)
135. Walle, T., Ishizaki, T. und Gaffney, T.E., J. Pharmacol. Exptl. Therapeut. 508, 508-512 (1972)
136. Walle, T., Morrison, J.I. und Tindell, G.L., Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 1, 1-8 (1974)
137. Walle, T., Morrison, J., Walle, K. und Conradi, E., J. Chromatogr. 114, 351-359 (1975)
138. Weil-Malherbe, H., Meth. Biochem. Anal. 16, 293-326 (1967)
139. Wilk, S., Gitlow, S.E., Mendlowitz, M. und Clarke, D.D., Fedn. Proc. 25, 736 (1966)
140. Zarnak, J. und Pfeiffer, S., Pharmazie 19, 216 (1964)

Nachtrag

- 141. Offerhaus, L. und van der Vecht, J.R., Brit.J.Clin.Pharmacol. 3, 1061 (1976)
- 142. Tindell, G.L., Walle, T. und Gaffney, T.E., Life Sci. 11, 1029-1036 (1972)
- 143. Merck's Reagenzienverzeichnis, 4.Aufl., 216, Springer-Verlag, Berlin 1916
- 144. Burgett, C.A., Smith, D.H., Bente, H.B., Wirfel, J.C. und Goodhart, S.E., Application Note Hewlett-Packard, 2 (1976)

Lebenslauf

30.01.1951 Geboren in Rott am Inn
 Vater : Ludwig Riedl, Möbelfabrikant
 Mutter: Elisabeth Riedl, geb. Rieder

1957-1961 Besuch der Volksschule in Rott am Inn

1961-1971 Besuch des mathematisch-naturwissenschaft-
 lichen Luitpold-Gymnasium in Wasserburg
 am Inn

19.06.1971 Abitur in Wasserburg am Inn

01.07.1971- Grundwehrdienst in Landsberg am Lech
 31.12.1972 und Bad Reichenhall

1972-1976 Wartesemester in den Studiengängen
 Physik und Architektur

12.09.1975 Eheschließung mit Kollegin Astrid Eberl
 aus München

SS 1976 Zulassung zum Studium der Zahnmedizin
 zum dritten Semester unter Anrechnung
 zweier Fachsemester aus dem Studium
 der Physik

25.10.1976 Naturwissenschaftliche (zahnärztliche)
 Vorprüfung in München

31.10.1977 Zahnärztliche Vorprüfung in München

ab Nov.1977 Doktorand bei Prof. Dr. med. W. Spann
 am Institut für Rechtsmedizin der
 Universität München

